

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andreas Neubauer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

Einfluss der Oberflächenmarkerexpression auf Leukozyten von  
Hodentumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien auf das rezidivfreie  
Überleben nach Hochdosismotherapie und autologer  
Stammzelltransplantation

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Verena Christina Nilius-Eliliwi aus Tübingen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
27.11.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. Cornelia Brendel

1. Korreferent: Prof. Dr. Axel Hegele

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Nicht-kommerziell  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
4.0 International Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Abstract .....	1
2	Zusammenfassung .....	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Hodentumore .....	5
3.2	Immunsystem und Tumorzellen .....	9
3.3	Auswahl der Zielmoleküle .....	10
3.3.1	CD31 .....	10
3.3.2	CD49d .....	11
3.3.3	CD184 .....	12
3.3.4	B4GALT1.....	12
3.3.5	IL10 .....	13
3.4	Fragestellung .....	14
4	Material und Methoden .....	15
4.1	Material .....	15
4.1.1	Lösungen und Chemikalien .....	15
4.1.2	Antikörper .....	16
4.1.3	Primer.....	16
4.1.4	Zellen.....	16
4.1.5	Geräte .....	18
4.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	18
4.2	Methoden .....	19
4.2.1	Dichtegradientenzentrifugation .....	19
4.2.2	Durchflusszytometrie .....	21
4.2.3	RNA-Extraktion.....	26

4.2.4	cDNA Synthese .....	26
4.2.5	Quantitative PCR.....	27
4.2.6	Statistische Auswertung .....	32
5	Ergebnisse .....	34
5.1	Analyse des Patientenkollektivs .....	34
5.2	Durchflusszytometrische Quantifizierung von Oberflächenmolekülen .....	36
5.2.1	CD31 .....	37
5.2.2	CD49d .....	40
5.2.3	CD184 .....	42
5.3	Quantitative PCR .....	45
5.3.1	B4GALT1.....	45
5.3.2	IL10 .....	49
5.4	Kaplan-Meier Analyse .....	52
5.5	Cox-Regressionsanalyse .....	53
6	Diskussion .....	54
7	Literaturverzeichnis .....	58
8	Abbildungsverzeichnis .....	68
9	Tabellenverzeichnis .....	70
10	Anhang.....	71
10.1	Tabellarischer Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	71
10.3	Danksagung.....	72
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 1 Abstract

Testicular cancer is the most common tumor in 15 to 45 year old men. Even in advanced stages it has a quite good prognosis with a survival rate of about 70-80%. In order to better estimate the prognosis of those patients with metastatic or relapsed disease the International Germ Cell Collaborative Group has developed a score (IPF-score).

In the last years a lot of research on the field of tumorimmunology has been done. In Non-small cell lung cancer proteins that are part of the leukocyte adhesion pathway have a significant influence on the relapse probability of the patients. Furthermore the enzyme  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase was found to be significantly higher in patients who do not suffer a relapse of disease. In testicular germ cell tumors little is known about tumorimmunologic interactions so far. Besides most of the studies have investigated the expression levels on the tumor cells themselves. In this paper we tested them on the patients' leucocytes. This study was supposed to investigate the influence of B4GALT1, as well as different surface molecules, which are part of the leukocytes adhesion pathway, on the relapse probability of the patients. Three different surface markers were chosen for analysis. Those were platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1), very late antigen 4 (VLA-4) and CXC receptor 4 (CXCR4). Furthermore we measured the expression of IL10, which has impact on tumor control because of immunoregulatory functions.

All of the 46 patients received high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. During stem cell apheresis retention samples were taken. Patients had given written informed consent in research usage of the samples. The surface expression levels of PECAM-1, VLA-4 and CXCR4 were measured with flow cytometry. Moreover T-cells and monocytes were separated from the other cells. Afterwards RNA was extracted from all cells in order to determine mRNA-expression levels of B4GALT1 and IL10 with real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). For analysis the IPF-score of all patients was calculated and patients were grouped according to the further course of disease into the groups "no relapse", "early relapse" and "late relapse". The analysis of the surface marker expression levels did not show any significant differences

between the groups neither for T-cells nor for monocytes. Whereas the expression of B4GALT1 was significantly higher in T-cells of patients without relapse compared to the other groups. In monocytes and the all cell-population no differences were found. Kaplan-Meier analysis showed that patients with a high B4GALT1 expression in T-cells had a longer relapse-free survival. This study was conducted with a limited number of thawed patient samples. For validation of the results, further studies, such as prospective trials, are needed.

## 2 Zusammenfassung

Hodentumore stellen die häufigste Tumorentität bei 15- bis 45-jährigen Männern dar. Auch in fortgeschrittenen Stadien hat die Erkrankung mit einer Überlebensrate von 70-80% eine vergleichsweise gute Prognose. Um die Prognose insbesondere in diesen Stadien besser abschätzen zu können, wurde von der „International Germ Cell Collaborative Group“ ein Punktesystem entwickelt (IPF-Score).

In den letzten Jahren wurde intensiv auf dem Gebiet der Tumorimmunologie geforscht. Für Zellen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms stellte sich heraus, dass insbesondere die Expression von Proteinen, die an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind, einen signifikanten Einfluss auf die Rezidivhäufigkeit der Patienten haben. Des Weiteren korrelierte die Expression des Enzyms  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (B4GALT1) signifikant mit der Rezidivwahrscheinlichkeit. Für testikuläre Keimzelltumore ist bislang wenig über tumorimmunologische Zusammenhänge bekannt. Um jene zu beleuchten, sollte in dieser Arbeit der Einfluss sowohl von B4GALT1, als auch von an der Leukozytenadhäsion beteiligten Oberflächenmolekülen auf die Rezidivwahrscheinlichkeit der Patienten untersucht werden. Dazu wurden drei an der Leukozytenadhäsion beteiligte Oberflächenmarker ausgewählt. Diese waren das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 (englisch platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM1), das  $\alpha$ 4- $\beta$ 1-Intergrin (englisch very late antigen 4, VLA-4) und der CXC Chemokin Rezeptor 4 (CXCR4). Des Weiteren wurde die Expression von IL10 bestimmt, welches durch immunregulatorische Funktionen ebenfalls Einfluss auf die Tumorkontrolle hat. Die Untersuchungen wurden im Gegensatz zu den oben genannten an den Leukozyten, nicht den Tumorzellen durchgeführt, um die tumorimmunologischen Zusammenhänge von anderer Seite zu betrachten.

Bei den Patienten handelte es sich um 46 Hodentumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien, die allesamt eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation erhalten hatten. Im Rahmen der Stammzellapharese waren Rückstellproben eingefroren worden. In die Verwendung dieser zu Forschungszwecken hatten die Patienten schriftlich eingewilligt. Die Oberflächenexpression von PECAM-1, VLA-4 und



CXCR4 wurde durchflusszytometrisch gemessen. Außerdem wurden die Zellen in die Fraktionen Monozyten, T-Lymphozyten und übrige mononukleären Zellen sortiert. Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion wurde die mRNA-Expression von B4GALT1 und IL10 bestimmt. Für die Analyse der Daten wurde der IPF-Score berechnet und die Patienten nach dem weiteren Krankheitsverlauf in die Gruppen „kein Rezidiv“, „Frührezidiv“ und „Spätrezidiv“ eingeteilt. Die Analyse der Oberflächenmarkerexpression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen, weder auf Monozyten noch auf T-Lymphozyten. Die Expression von B4GALT1 war auf T-Lymphozyten, nicht jedoch auf Monozyten oder der Gesamtpopulation, der Gruppe „kein Rezidiv“ signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen. Eine Kaplan-Meier Analyse zeigte weiterhin, dass diejenigen Patienten mit einer hohen B4GALT1-Expression in T-Zellen ein signifikant längeres Rezidiv freies Überleben hatten.

Die hier vorliegende Untersuchung fand an einer limitierten Anzahl von aufgetauten Patientenproben statt. Um die Ergebnisse zu validieren, sind in Zukunft noch weitere Untersuchungen, beispielsweise als prospektive Studie, nötig.

## 3 Einleitung

### 3.1 Hodentumore

Hodentumore sind insgesamt für ca. 1% aller Malignome bei Männern verantwortlich<sup>1</sup>. In der Gruppe der 15- bis 45-Jährigen stellen sie die häufigste Tumorentität dar<sup>2</sup>. Es werden zwei große Gruppen unterschieden, wobei die Gruppe der testikulären Keimzelltumore mit 95% den weitaus größten Anteil stellt. Bei den übrigen Tumoren handelt es sich um Keimstrang-Stroma-Tumore. Die große Gruppe der Keimzelltumoren setzt sich zu ungefähr gleichen Teilen aus Seminomen und Nicht-Seminomen zusammen, wobei die Gruppe der Nicht-Seminome aus verschiedenen histologischen Untergruppen besteht, die entweder in reiner Form oder öfter als Mischtumore vorkommen<sup>3</sup>.

Für die Ätiologie spielen verschiedene Komponenten eine Rolle. Bisher konnten sowohl genetische, als auch als verschiedene Umweltfaktoren identifiziert werden, die das Risiko an einem Hodentumor zu erkranken, erhöhen. Das Risiko erstgradiger Verwandter ist um das Vier- bis Sechsfache bei Söhnen bzw. das Acht- bis Zehnfache bei Brüdern eines Betroffenen erhöht<sup>4</sup>. Auch Patienten mit Down-Syndrom oder Hodendysgenesiesyndrom haben eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit<sup>5</sup>. Insbesondere Kryptorchismus stellt einen weiteren eindeutig belegten Risikofaktor dar. Dabei ist vor allem entscheidend, wann die Orchidopexie durchgeführt wird. Wird vor dem Eintritt der Pubertät operiert, liegt das relative Risiko bei ca. 2,2. Bei einer Operation nach dem 13. Lebensjahr beträgt das relative Risiko ca. 5,4<sup>6</sup>.

In den allermeisten Fällen stellen sich die Patienten mit einer schmerzlosen Raumforderung im Hoden vor. Die Diagnostik umfasst primär eine klinische Untersuchung, sowie eine Sonographie des Hodens. Tumorverdächtig ist eine hypoechogene Struktur. Da diese nicht biopsiert werden darf, um eine Verschleppung der etwaigen malignen Zellen zu verhindern, wird eine radikale, inguinale Orchidektomie mit diagnostischer und zugleich therapeutischer

---

<sup>1</sup> Siegel et al. 2011

<sup>2</sup> Hartmann und Lorch 2011

<sup>3</sup> Hirsch 2014

<sup>4</sup> Hemminki und Li 2004

<sup>5</sup> Dalgaard et al. 2012

<sup>6</sup> Pettersson et al. 2007

Intention durchgeführt. Zuvor sollte der Patient über Möglichkeiten zur Kryokonservierung der Spermien aufgeklärt werden. Die meisten Patienten werden in lokalisierten Stadien diagnostiziert. Symptome einer fortgeschrittenen Erkrankung bestehen unter anderem in Rückenschmerzen durch retroperitoneale Lymphknotenpakete, sowie Kopfschmerzen oder Husten und Hämoptysen durch Fernmetastasierung. Das weitere Staging umfasst Computertomographien (CT) oder Magnetresonanztomographien (MRT) von Abdomen und Becken, sowie ein Röntgen-Thorax. Ein CT Thorax wird bei auffälligem Röntgenbefund durchgeführt. Außerdem werden die Serumspiegel von Alpha-Fetoprotein (AFP), der beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. AFP und/oder  $\beta$ -HCG sind in 80-85% der Patienten mit Nicht-Seminomen erhöht. Bei reinen Seminomen ist AFP niemals und  $\beta$ -HCG nur in 20% der Fälle erhöht. Die Bestimmung der Tumormarker dient in erster Linie zur Verlaufskontrolle und weniger zur Diagnosestellung<sup>7</sup>.

Die Stadien Einteilung erfolgt anhand der American Joint Committee on Cancer (AJCC)-Klassifikation.

Stadium	TNM
IA	pT1 N0 M0 S0
IB	pT2-4 N0 M0 S0
IC	pT1-4 N0 M0 S1-3
IIA	pT1-4 N1 M0 S0-1
IIB	pT1-4 N2 M0 S0-1
IIC	pT1-4 N3 M0 S0-1
IIIA	pT1-4 N0-3 M1a S0-1
IIIB	pT1-4 N1-3 M0 S2
IIIC	pT1-4 N1-3 M0-1a S3 M1b S0-3

**Tabelle 3-1 Stadieneinteilung der testikulären Keimzelltumore nach der AJCC-Klassifikation<sup>8</sup>.**

Abkürzungen: p: pathologisch, T: Tumorstatus, N: Lymphknotenstatus, M: Fernmetastasen, S: Tumormarkerhöhe

<sup>7</sup> Steele et al. 2015

<sup>8</sup> Preiß et al. 2017

Die Therapie der Wahl besteht zunächst immer in der Orchidektomie. Dabei sollte stets auch die kontralaterale Seite biopsiert werden, um eine testikuläre intraepitheliale Neoplasie auszuschließen. Die weitere Therapie richtet sich nach dem Tumorstadium und der Histologie.

Stadium	Therapiestrategien
I	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. „Active Surveillance“ oder</li> <li>2. 1x Carboplatin oder</li> <li>3. RTx 20Gy, infradiaphragmale, paraaortale, parakavale LK</li> </ol>
IIA	RTx 30Gy, mit ipsilateralen inguinalen LK
IIB	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. RTx 36Gy wie IIA oder</li> <li>2. 3x PEB</li> </ol>
IIC-III	<p>Gute Prognose: 3xPEB Intermediäre Prognose: 4xPEB</p> <p>Bei Resttumor &gt; 3 cm und positivem PET Resektion→ bei histologisch vitalem Tumorgewebe weitere CTx</p>

**Tabelle 3-2 Stadienabhängige adjuvante Therapie des Seminoms<sup>9</sup>.**

Abkürzungen: RTx: Strahlentherapie, LK: Lymphknoten, PEB: Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin, PET: Positronenemissionstomographie, CTx: Chemotherapie

---

<sup>9</sup> Preiß et al. 2016

Stadium	Therapiestrategien
I	1. „Active Surveillance“ oder 2. 1x PEB oder 3. Selten RPLA
IIA S0	1. CT-Kontrolle nach 6 Wochen oder 2. 3x PEB, evtl. Residualtumorresektion oder 3. RPLA
IIA S1, IIB S0-1	3x PEB und evtl. Residualtumorresektion
IIC-III	Immer Residualtumorresektion, wenn möglich Gute Prognose: 3xPEB oder 4xPE Mittlere Prognose: 4xPEB oder PEI Schlechte Prognose: 4xPEB oder PEI, evtl. HDCT erwägen

**Tabelle 3-3 Stadienabhängige adjuvante Therapie des Nicht-Seminoms<sup>10</sup>**

Abkürzungen: PEB: Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin, RPLA: retroperitoneale Lymphadenektomie, CT: Computertomographie, PE: Polychemotherapie mit Cisplatin und Etoposid, PEI: Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid, HDCT: Hochdosischemotherapie

Im Allgemeinen hat die Hodentumorerkrankung, insbesondere verglichen zu anderen malignen Erkrankungen, eine gute Prognose. Bei Betrachtung aller Stadien liegt das Überleben bei ca. 95%<sup>11</sup>. Auch in fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien, sowie im Rezidiv haben die Patienten eine vergleichsweise gute Prognose. In metastasierten Stadien überleben bis zu 80% der Patienten<sup>12</sup>. Bis zu 70% können auch nach einem Rezidiv geheilt werden<sup>13</sup>.

Zur besseren Einschätzung der Prognose bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien wurde der International prognostic factors study group (IPF)-score etabliert<sup>14</sup>. Das Punktesystem setzt sich wie in Tabelle 3-4 gezeigt zusammen. Die Summe zwischen null und zehn Punkten wird dann wie in Tabelle 3-5 gezeigt der jeweiligen Risikogruppe mit der entsprechenden 3-Jahres-

<sup>10</sup> Preiß et al. 2016

<sup>11</sup> Hanna und Einhorn 2014

<sup>12</sup> Hanna und Einhorn 2014

<sup>13</sup> Hartmann und Lorch 2011

<sup>14</sup> Lorch et al. 2010

Überlebensrate (JÜR) zugeordnet. Patienten mit reinen Seminomen werden bei gleicher Punktzahl eine Kategorie herunter gestuft. Dadurch ergibt sich die Risikogruppe „Sehr niedrig (-1)“.

Parameter	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Primärer Tumormanifestationsort	Gonadal	Extra-Gonadal	-	Mediastinal (Nicht-Seminom)
Primäres Therapieansprechen	CR/PRm-	PRm+/SD	PD	-
PFI [Monate]	>3	≤3	-	-
AFP Höhe salvage	Norm	≤1000	>1000	-
HCG Höhe salvage	≤1000	>1000	-	-
Leber, Gehirn oder Knochen Metastasen	Nein	Ja	-	-

**Tabelle 3-4 Parameter des IPF-Scores.**

Abkürzungen: CR: complete remission (deutsch: komplette Remission), PR: partial remission (deutsch: partielle Remission), m+: Marker positiv, m-: Marker negativ, SD: stable disease (deutsch: stabile Erkrankung), PD: progressive disease (deutsch: fortschreitende Erkrankung), PFI: progressionsfreies Intervall

Punktzahl	Risikogruppen	3-JÜR [%]
-1	Sehr niedrig (-1)	77,0
0	Niedrig (0)	65,6
1-2	Mittel (1)	58,3
3-4	Hoch (2)	27,1
≥5	Sehr hoch (3)	6,1

**Tabelle 3-5 Zuordnung der Risikogruppen anhand der Punktesumme und zugehörige 3-Jahresüberlebensraten.**

Abkürzungen: 3-JÜR: 3-Jahresüberlebensrate.

## 3.2 Immunsystem und Tumorzellen

Es wurde bereits von vielen Gruppen gezeigt und ist seit den 60er Jahren allgemein anerkannt, dass immunobiologische Einflüsse eine große Rolle bei der Tumorkontrolle spielen<sup>15,16,17</sup>, indem Lymphozyten stetig mutierte Zellen

<sup>15</sup> Mantovani et al. 2008

<sup>16</sup> Kamta et al. 2017

<sup>17</sup> Baldwin 1966

eliminieren. Im Jahr 2011 wurden daher auch die „hallmarks of cancer“ nach Hanahan und Weinberg um diesen Aspekt erweitert<sup>18</sup>.

Leukozytenintegrin-Signalwege stellten sich beispielsweise im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (englisch Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) als prognostisch relevant heraus<sup>19</sup>. Außerdem konnten genetische Analysen in Mammakarzinom-Zellen zeigen, dass die Expression von Genen, die an Interaktionen mit dem Immunsystem beteiligt sind, mit dem klinischen Verlauf der Patienten korrelieren<sup>20</sup>. Auch bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) wurden die Einflüsse der Immunzellen auf die Tumorkontrolle nachgewiesen. So führte T-Zellstimulation mit Interferon-alpha (INF- $\alpha$ ) hier zu einer verlängerten molekularen Remission<sup>21,22</sup>.

Aktuell ergeben immer mehr neue Therapieansätze, die diese körpereigenen Strategien und Mechanismen zur Tumorbekämpfung imitieren, unterstützen oder reaktivieren<sup>23</sup>.

### **3.3 Auswahl der Zielmoleküle**

Für NCSLC konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Gene in den Tumorzellen mit der Höhe der Rezidivwahrscheinlichkeit korreliert<sup>24</sup>. Bei den hier besonders relevanten Genen handelte es sich unter anderem um B4GALT1, sowie um die an dem KEGG Signalweg „hsa 04670“<sup>25</sup> beteiligten. Dieser Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenmigration durch die Gefäßwände zum Ort der Entzündung. Auf dieser Grundlage wurden für die Untersuchungen Proteine aus dem oben genannten Signalweg, sowie B4GALT1 als Zielmolekül gewählt. Des Weiteren wurde IL10 hinzugenommen, welches als immunoregulatorisches Zytokin Einfluss auf die Tumorkontrolle hat.

#### **3.3.1 CD31**

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 (englisch platelet endothelial adhesion molecule 1, PECAM1), auch als CD31 (cluster of

---

<sup>18</sup> Hanahan und Weinberg 2011

<sup>19</sup> Lu et al. 2012

<sup>20</sup> Perez et al. 2015

<sup>21</sup> Burchert et al. 2010

<sup>22</sup> Burchert et al. 2015

<sup>23</sup> Kamta et al. 2017

<sup>24</sup> Lu et al. 2012

<sup>25</sup> Kanehisa Laboratories

differentiation) bezeichnet, ist ein 130 kDa wiegendes Protein aus der Immunglobulin Superfamilie<sup>26</sup>. Es wird auf der Oberfläche von Endothel- und vielen Blutzellen exprimiert<sup>27</sup>. Besonders stark gebildet wird es auf allen Zellen der myeloiden und megakaryozytischen Zellreihe. Auch zu finden ist PECAM1 auf den meisten CD34-positiven Vorläuferzellen und auf manchen T-Zelluntergruppen. Auf Erythrozyten und reifen B-Zellen geht die Expression verloren<sup>28,29</sup>. PECAM1 spielt eine Rolle bei der Vaskularisation, sowie der Translokation von Blutzellen durch die Gefäßwände<sup>30</sup>. Bei diversen Neoplasien konnte die Expression von CD31 auf den Tumorzellen mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden<sup>31,32,33</sup>. Dies beruht wahrscheinlich auf seiner Eigenschaft den intrinsischen Weg der Apoptose zu hemmen<sup>34</sup>.

### 3.3.2 CD49d

Very late antigen 4 (VLA-4) oder CD49d sind verschiedene Bezeichnungen für das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin. Gemeinsam mit anderen Integrinen ist es beteiligt an dem sog. „homing“, welches die Rückkehr von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das Knochenmark beschreibt<sup>35,36</sup>. Insgesamt spielt CD49d an vielen Stellen eine Rolle in der Leukozyten Adhäsion und Extravasation. So zum Beispiel bei der Auswanderung von Leukozyten in Gebiete von Wundheilung und Tumor-Neoangiogenese<sup>37</sup>. Des Weiteren trägt VLA-4 einen großen Teil zur Bildung der sog. „prämetastatischen Nische“ bei. Diese besteht aus VLA-4-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche sich zunächst am Ort der zukünftigen Metastasierung einfinden und anschließend Tumorzellen über Chemokine anlocken<sup>38</sup>.

---

<sup>26</sup> Watt et al. 1993

<sup>27</sup> Alevizos et al. 2012

<sup>28</sup> Bergom et al. 2005

<sup>29</sup> Jackson et al. 2000

<sup>30</sup> Alevizos et al. 2012

<sup>31</sup> Alevizos et al. 2012

<sup>32</sup> Charpin et al. 1997

<sup>33</sup> Charpin et al. 1995

<sup>34</sup> Gao et al. 2003

<sup>35</sup> Papayannopoulou et al. 2001

<sup>36</sup> Papayannopoulou et al. 1995

<sup>37</sup> Jin et al. 2006

<sup>38</sup> Kaplan et al. 2005



### 3.3.3 CD184

CXC Chemokin Rezeptor 4 (CXCR4) oder CD184 bindet an den CXC Chemokin Ligand 12 (CXCL12), auch bekannt als stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ). Diese Bindung kann durch den spezifischen Inhibitor Plerixafor verhindert werden<sup>39</sup>, wodurch eine Ausschwemmung hämatopoetischer Stammzellen in das periphere Blut erreicht werden kann. CXCR4 findet sich kaum auf gesundem Gewebe<sup>40,41</sup>. Es lässt sich jedoch in über 23 Tumorgeweben nachweisen<sup>42</sup>. Dort scheint es eine Rolle bei der Metastasierung der Tumorzellen zu spielen<sup>43,44,45,46</sup>. So führt die Blockade beispielsweise zu deutlich weniger invasiven Mammakarzinomen<sup>47</sup> und malignen Melanomen<sup>48</sup>. Im Bereich des follikulären Lymphoms konnte gezeigt werden, dass CXCR4-CXCL12 Interaktionen der Tumorstammzellen mit follikulären dendritischen Zellen zur Chemotherapieresistenz der Zellen beiträgt<sup>49</sup>. Die Expression wird unter dem Einfluss von Hypoxie<sup>50,51</sup>, dem vaskulären Wachstumsfaktor (englisch vascular endothelial growth factor, VEGF)<sup>52</sup>, dem weiblichen Sexualhormon Östrogen<sup>53</sup>, sowie dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B<sup>54</sup> hoch reguliert.

### 3.3.4 B4GALT1

Das Enzym Beta-1,4-Galactosyltransferase (B4GALT1) gehört zu einer Gruppe von sieben membrangebundenen Glycoproteinen, die Galactose von UDP-Galactose auf N-acetylglucosamin-Reste übertragen<sup>55</sup>. Es existieren zwei Isoformen der zugehörigen mRNA. Zum einen eine kurze Form von 3,9 kb Länge. Diese Variante codiert für eine lösliche Form der Lactose Synthase.

---

<sup>39</sup> Lee et al. 2012

<sup>40</sup> Wai Wong et al. 2012

<sup>41</sup> Balkwill 2004a

<sup>42</sup> Balkwill 2004b

<sup>43</sup> Müller et al. 2001

<sup>44</sup> Balkwill 2004a

<sup>45</sup> Balkwill 2004b

<sup>46</sup> Scala et al. 2006

<sup>47</sup> Chen et al. 2003

<sup>48</sup> Bartolome et al. 2004

<sup>49</sup> Lee et al. 2012

<sup>50</sup> Staller et al. 2003

<sup>51</sup> Schioppa et al. 2003

<sup>52</sup> Bachelder et al. 2002

<sup>53</sup> Hall und Korach 2003

<sup>54</sup> Helbig et al. 2003

<sup>55</sup> National Center for Biotechnology Information und U.S. National Library of Medicine 2017

Zum anderen eine längere Version mit 4,1 kb, die als Membranprotein fungiert und in den hier beschriebenen Experimenten von Bedeutung ist<sup>56</sup>. B4GALT1 wird auch in Leukozyten exprimiert und spielt dort eine entscheidende Rolle in Zell-Adhäsions-Signalwegen, wie zum Beispiel in dem KEGG Signalweg „hsa04670“<sup>57</sup>. Außerdem scheint es ein wichtiger Bestandteil in Adhäsionsmechanismen zwischen CD4-positiven T-Zellen und dendritischen Zellen zu sein<sup>58</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass B4GALT1 auch an dem Prozess der Tumor Metastasierung beteiligt ist<sup>59,60</sup>, sowie an der antigenabhängigen Differenzierung von B-Zellen<sup>61</sup>. O-Glykane, deren Synthese von B4GALT1 stimuliert wird, werden zur Herstellung von CD62L Liganden benötigt<sup>62</sup>. Diese wiederum tragen entscheidend zur Migration von T-Zellen in die Lymphknoten und den Thymus, sowie an Orte der Inflammation oder Tumorgenese bei<sup>63,64</sup>. Wie oben bereits erwähnt korreliert eine hohe Expression von B4GALT1 bei NSCLC mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben<sup>65</sup>.

### 3.3.5 IL10

IL10 ist bekannt als insbesondere anti-inflammatorisches Zytokin, welches überwiegend von Monozyten und verschiedenen T-Zellpopulationen sezerniert wird. In Bezug auf Tumorwachstum konnten für IL10 bereits verschiedene Funktionen gezeigt werden. Dabei handelt es sich sowohl um Tumorwachstum fördernde, als auch hemmende Effekte<sup>66</sup>. Im Zusammenhang mit Mammakarzinomen beispielsweise fand sich eine hohe IL10 Expression bei Patientinnen mit weniger aggressiven Formen<sup>67</sup>. Auch in NSCLC stellte eine geringe Expression einen negativen prognostischen Faktor dar<sup>68</sup>. Andererseits führten IL10 stimulierte Makrophagen zu einem stärkeren Tumorwachstum, beispielsweise bei Burkitt Lymphomen<sup>69</sup>. Bei Patienten mit diffus großzelligem

---

<sup>56</sup> Russo et al. 1990

<sup>57</sup> Kanehisa Laboratories

<sup>58</sup> Cheng et al. 2010

<sup>59</sup> Poeta et al. 2012

<sup>60</sup> Johnson und Shur 1999

<sup>61</sup> Kim et al. 2003

<sup>62</sup> Lee et al. 2014

<sup>63</sup> Arbones et al. 1994

<sup>64</sup> Austrup et al. 1997

<sup>65</sup> Lu et al. 2012

<sup>66</sup> Candido und Hagemann 2013

<sup>67</sup> Li et al. 2014

<sup>68</sup> Lu et al. 2004

<sup>69</sup> Ogden et al. 2005

B-Zelllymphom, die einen schlechteren Verlauf hatten, fanden sich ebenso erhöhte IL10-Spiegel<sup>70,71</sup>.

### **3.4 Fragestellung**

In vielen Tumorgeweben konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlich hohe Expression von bestimmten Genen zu einer Veränderung der Tumorkontrolle, gemessen unter anderem in Rezidiv Wahrscheinlichkeit, Tumorinvasivität oder Überleben, führt. Die hier gefundenen Gene bzw. Proteine gehören dabei oftmals zu einer Gruppe von Genen oder Proteinen, die in die Interaktion mit Leukozyten oder deren Funktion eingebunden sind. Diese Erkenntnisse führen zu der Frage, inwiefern sich auch auf den Leukozyten unterschiedliche Genexpressionen nachweisen lassen, die zu einer Veränderung der Tumorkontrolle führen.

---

<sup>70</sup> Lech-Maranda et al. 2004

<sup>71</sup> Lech-Maranda et al. 2006

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Lösungen und Chemikalien

Lösung/Chemikalie	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
AmpliTaQ® DNA Polymerase	Applied Biosystems® by Life Technologies®, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cyclodextrin Mn1310	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) 10mM	Qiagen, Hilden
Dimethylsuloxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
Ficoll-Paque Plus®	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
GeneAmp® 10X PCR-Puffer	Applied Biosystems® by Life Technologies, Darmstadt
Glykogen	Peglab, Erlangen
Humanes Serum Albumin (HSA)	CSL Behring, Marburg
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl) 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Omniscript® Reverse Transkriptase (RT) 4U/µl	Qiagen, Hilden
pegGOLD Trifast®	Peglab, Erlangen
Phosphate buffered saline (PBS) Tabletten für destilliertes Wasser	Life Technologies, Darmstadt
Random Hexamer primer 100µM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Reverse Transkriptase (RT)-Puffer 10x	Qiagen, Hilden
rRNasin 40U/µl	Promega, Fitchburg, USA
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren
SYBRGreen® MasterMix	Qiagen, Hilden
SYTOX® Blue Dead cell stain	Life Technologies, Darmstadt
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer 1x	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 4.1.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Human CD31, Clone: M89D3	BD Biosciences, Heidelberg
CD14 Antikörper Human, PerCP konjugiert, Clone: TÜK4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD49d Antikörper Human, APC konjugiert, Clone: MZ18-24A9	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PE Mouse Anti-Human CD184, Clone: 12G5	BD Biosciences, Heidelberg
BD Horizon® V450 Mouse Anti-Human CD3, Clone: UCHT1	BD Biosciences, Heidelberg

#### 4.1.3 Primer

Das Erstellen der Primersequenzen erfolgte mithilfe der „Primer BLAST“-Software des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Primer	Sequenz	Hersteller
Abl forward	5'-tcatgaaagagatcaaacacccta-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Abl reverse	5'-catgaactcagtgatgatatagaacg-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
B4GALT1 left	5'-tgaccataatgcgtacaggtg-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
B4GALT1 right	5'-ccaaaataactgaacataaggtaggc-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL10 forward	5'-agaacctgaagaccctcaggc-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL10 reverse	5'-ccacggccttgctctgtt-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

#### 4.1.4 Zellen

Bei KG1A handelt es sich um einen Subklon einer humanen akuten myeloischen Leukämie (AML)-Zelllinie, die aus Knochenmarksaspirat eines 59-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen wurde<sup>72</sup>. RNA aus diesen Zellen wurde zur Erstellung der Standardkurve für die qPCR verwendet.

<sup>72</sup> Koeffler et al. 1980

Die OCI-AML3 Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen AML-Patienten etabliert. Diagnose und Kultur der Zelllinie erfolgte 1987<sup>73</sup>.

Bei HL60 handelt es sich um eine humane Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie. Sie wurde in den 70er-Jahren am National Cancer Institute von einer 36-jährigen Frau gewonnen<sup>74</sup>. OCI-AML3 und HL60-Zellen wurden in der Gradienten-PCR zur Verwendung für die qPCR Standardkurve getestet.

Bei den Patientenproben handelt es sich um Rückstellproben, die bei der Leukozytenapharese für die autologe Stammzelltransplantation im Rahmen der Hochdosischemotherapie gewonnen und in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Zwischen Mai 1999 und Januar 2012 wurden insgesamt 73 Patienten in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg behandelt. Die primäre Diagnose und Therapie fand in unterschiedlichen Zentren in Deutschland statt und die Patienten wurden bei Fortschreiten oder Rezidiv der Erkrankung in Marburg vorgestellt. Die Patienten willigten schriftlich in die Verwendung von überschüssigem Stammzellapharesat zu Forschungszwecken ein. 46 der Rückstellproben waren verfügbar und enthielten ausreichende Zellzahlen für die folgenden Analysen. 28 dieser Patienten wurden im Rahmen einer multizentrischen, randomisierten Phase-III Studie behandelt<sup>75</sup>. Die Studie untersuchte die Einflüsse einer dreimaligen versus einer einmaligen Hochdosischemotherapie, so dass die Patienten unterschiedlich viele Hochdosistherapien bekamen. Bei Patienten, die mehr als eine Hochdosischemotherapie erhielten, wurden für die Analyse Zellen aus der Stammzellapharese für den ersten Zyklus verwendet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Charité unter dem Ethikvotum Nr. 78/98 zugelassen. Im Rahmen der Studie lauteten die verwendeten Hochdosischemotherapieprotokolle wie folgt. Diejenigen 27 Patienten, die in den Arm mit drei Zyklen Hochdosischemotherapie randomisiert wurden, erhielten pro Zyklus je 1500 mg/m<sup>2</sup> Carboplatin und Etoposid. Aufgrund von Niereninsuffizienz wurde die Dosierung, wie im Studienprotokoll vorgesehen,

---

<sup>73</sup> Wang et al. 1989

<sup>74</sup> Gallagher et al. 1979

<sup>75</sup> Lorch et al. 2007

bei vier Patienten auf je 1200mg/m<sup>2</sup> reduziert. Ein Patient erhielt im Rahmen des anderen Armes einen Zyklus Hochdosistherapie mit 2200 mg/m<sup>2</sup> Carboplatin, 1800mg/m<sup>2</sup> Etoposid und 6400 mg/m<sup>2</sup> Cyclophosphamid. Außerhalb der Studie wurden 14 Patienten mit 225 mg/m<sup>2</sup> Paclitaxel, 100 mg/m<sup>2</sup> Cisplatin, 750 mg/m<sup>2</sup> Etoposid und 10 g/m<sup>2</sup> Ifosfamid pro Zyklus behandelt<sup>76</sup>. Von vier Patienten konnte die genaue Dosierung nicht eruiert werden. Da auch im Rahmen der Studie aufgrund von Toxizitäten oder Komplikationen nicht alle Patienten die tatsächlich vorgesehenen drei Zyklen erhielten, wurden insgesamt 27 Patienten mit drei, zwei Patienten mit zwei und 17 Patienten mit einem Zyklus Hochdosistherapie behandelt.

#### 4.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
CFX96 Real-Time PCR Detection System®	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Kammern	Biometra, Göttingen
UV-Geldokumentationsanlage	Peqlab, Erlangen
Heizblock Thermo Stat plus	Eppendorf, Hamburg
MoFlo®	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen
Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg

#### 4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Einweghandschuhe	NOBAMED, Wetter (Ruhr)
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (ohneFilter) - 10 µl - 200 µl - 1000 µ	Greiner Bio-one, Frickenhausen Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Micro-Filterspitze - 10 µl - 200 µl - 1000µ	Greiner Bio-one, Frickenhausen

<sup>76</sup> Hartmann und Lorch 2011

Serumpipetten 153mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Falcon - 15ml - 50ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
FACS®-Röhrchen 5ml	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well-Platten qPCR	Greiner Bio-one, Frickenhausen

## 4.2 Methoden

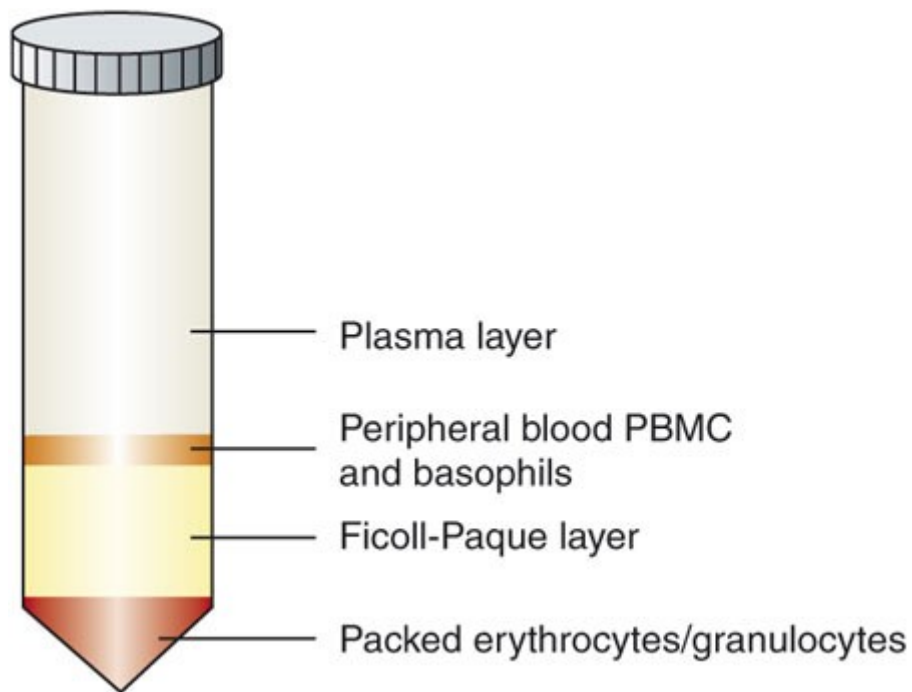
### 4.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation beruht auf der Trennung einer Lösung in ihre Bestandteile anhand der Unterschiede in Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit. Ficoll-Paque® besteht aus Sucrose und Epichlorohydrin und hat eine Dichte von  $1.077 \pm 0.001 \text{ g/m}^{77}$ . Nach Abschluss der Zentrifugation ergibt sich eine spezifische Schichtung, die in Abbildung 2-1 dargestellt ist. Dabei handelt es sich um vier Phasen. Am Boden des Gefäßes befindet sich ein Pellet, welches Erythrozyten und Granulozyten enthält. Darüber befindet sich die Phase mit dem Ficoll-Paque® Medium, gefolgt von dem sogenannten „buffy coat“, indem sich die mononukleären Zellen und basophilen Granulozyten befinden. Die oberste Phase besteht aus Blutplasma. Die Methode wird wie auch hier zur Separation der mononukleären Zellen eingesetzt. Diese befinden sich wie oben beschrieben in der mittleren flüssigen Phase, welche nach Abschluss der Zentrifugation vorsichtig entnommen werden muss.

---

<sup>77</sup> GE Healthcare Bio-Sciences AB 2014





**Abbildung 4-1 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque®<sup>78</sup>**

Abkürzungen: PBMC: peripheral blood mononuclear cells

In Vorbereitung auf die Dichtegradientenzentrifugation waren einige Schritte nötig. Die Zellen waren in 10%iger Dimethylsuloxid (DMSO)-Lösung eingefroren. Die Cryoröhrchen wurden auf Eis gestellt und ca. 10 Minuten zum Antauen stehen gelassen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Außerdem war die verwendete Zentrifuge auf 4°C gekühlt. Die Proben wurden in 5 ml eines Gemisches aus Natriumchlorid (NaCl) und 5% humanem Serumalbumin (HSA) resuspendiert. Anschließend wurden 3 ml Ficoll-Paque® Lösung vorgelegt und die Zellsuspension vorsichtig auf diese überschichtet, wobei eine Durchmischung der zwei Phasen strikt zu vermeiden war. Die Zentrifugation fand bei 800 g für 20 Minuten statt. Die Zentrifuge musste ohne Bremse auslaufen, um die entstandenen Phasen nicht wieder zu durchmischen. Um die mononukleären Zellen zu erreichen, wurde vorsichtig der Ring der mittleren flüssigen Phase mithilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in 8 ml NaCl mit 5% HSA resuspendiert. Daraufhin wurde eine Zentrifugation mit 350 g für 5 Minuten durchgeführt, um die Zellen von etwaigen Verunreinigungen durch

<sup>78</sup> Munoz und Leff 2006

das Ficoll-Paque® Medium zu säubern und des Weiteren im „buffy coat“ enthaltene Thrombozyten von den mononukleären Zellen zu trennen. Das Pellet wurde dann in einem ml PBS aufgenommen. 100µl dessen wurden abgenommen, um später aus diesen unsortierten Zellen ebenfalls RNA extrahieren zu können. Dazu wurde die RNA-Extraktion zunächst bis zum Schritt der Isopropanolzugabe durchgeführt (siehe 3.2.3). In dem Isopropanol wurde die Probe dann bei -80°C eingefroren und die weitere RNA-Extraktion später mit den sortierten Zellen gemeinsam fortgeführt.

#### **4.2.2 Durchflusszytometrie**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Erfassung verschiedener Eigenschaften von Zellen mithilfe von Lasern. Dazu werden die Zellen, von einem Hüllstrahl umgeben, in der Kapillare der Messküvette vereinzelt. Dadurch trifft jede Zelle separat auf einen Laserstrahl, dessen Licht von der Zelle gestreut wird. Aus dem Ausmaß der Streuung können Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Zelle gezogen werden. Das sog. Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) ist abhängig von der Größe der Zelle und wird in der gleichen Achse wie das einfallende Licht gemessen. Das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) entsteht durch die Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Es wird in einem 90°-Winkel zum einfallenden Licht erfasst<sup>79</sup>. Bei dem hier verwendeten MoFlo® Durchflusszytometer stehen zwei Laser zur Exzitation zur Verfügung. Zum einen ein blauer Argon-Laser, zum anderen ein roter Dioden-Laser. Zusätzlich können die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt werden. Die gebundenen Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren abhängig von der Art des Fluorochroms Licht eines bestimmten Wellenlängenspektrums. Bei den hier verwendeten Fluorochromen handelte es sich um Alexa Fluor® 488, Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Allophycocyanin (APC) und BD Horizon® V450. Das Emissionsmaximum von Alexa Fluor® 488 liegt bei 525nm; jenes von PE bei 575nm, von PerCP bei 675nm, von APC bei 660nm und das Emissionsmaximum von BD Horizon® V450 liegt bei 448nm. Je nach der

---

<sup>79</sup> Brown und Wittwer 2000

Intensität des emittierten Lichtes kann die Dichte des mit dem jeweiligen Antikörper markierten Oberflächenmoleküls auf der Zelle bestimmt werden. Des Weiteren können die Fluorochrom-markierten Antikörper zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen verwendet werden. Dazu stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Hier wurde der Farbstoff Sytox® Blue verwendet (vital stain). Dieser bindet an Nukleinsäuren, kann jedoch nur durch nicht mehr intakte Zellmembranen penetrieren und ist somit ein Indikator für nicht lebende Zellen. Das Emissionsmaximum liegt bei 470nm und wird damit in dem gleichen Kanal wie BD Horizon® V450 registriert. Die Fluoreszenzstärke liegt jedoch eine Log-Stufe über der von BD Horizon® V450, so dass die Populationen dennoch klar abgrenzbar dargestellt werden können. Das MoFlo® Durchflusszytometer verfügt über acht Kanäle (FL) zur Erfassung der Lichtemissionen. Dabei sollten sich die Emissionspektren der verwendeten Fluorochrome möglichst wenig überschneiden, um klare Abgrenzungen der Zellpopulationen vornehmen zu können. Die Kanäle wurden wie folgt belegt:

FL1: Alexa Fluor® 488

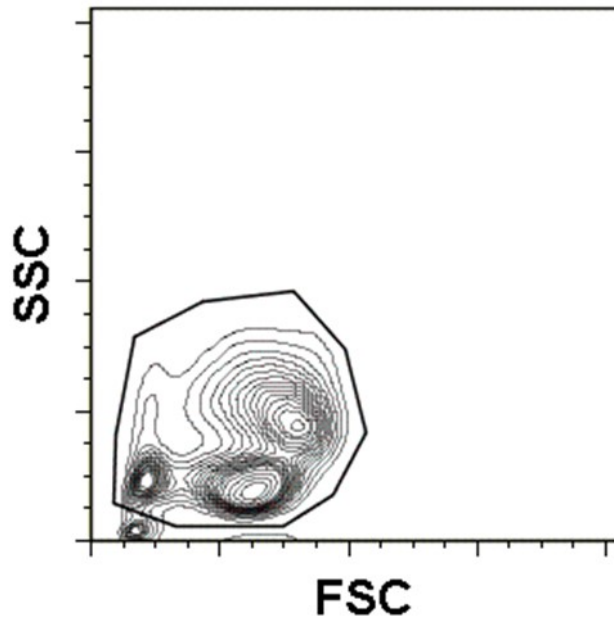
FL2: PE

FL3: PerCp

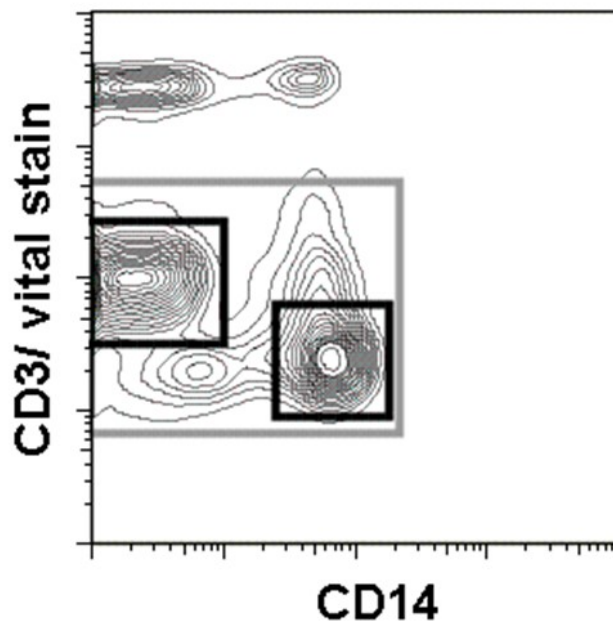
FL6: BD Horizon® V450

FL8: APC

Im Anschluss an die Messung der Parameter FSC, SSC und der Fluoreszenzintensitäten können die Zellen anhand dieser verschiedenen Populationen zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist in Abbildung 4-2 und 4-3 dargestellt.



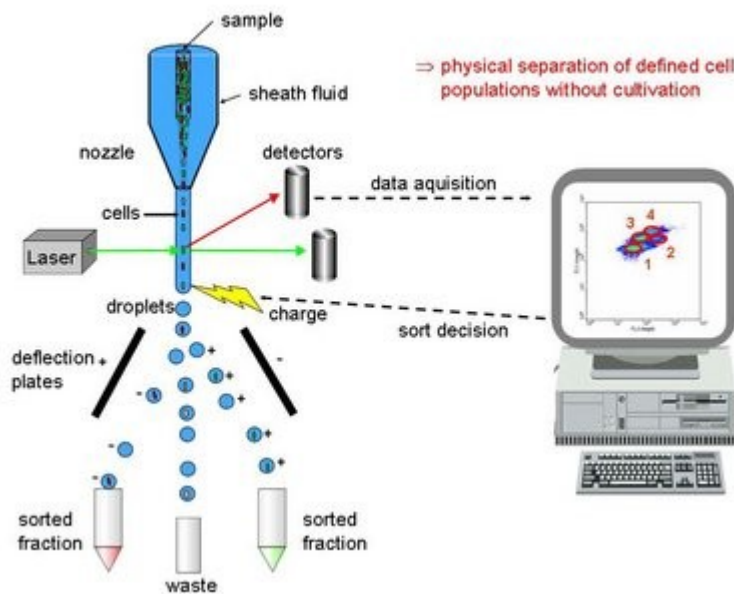
**Abbildung 4-2 Seitwärts- gegen Vorwärtsstreulichtdarstellung.** Die Darstellung dient zum Ausschluss der Zelltrümmer. Bei der Population innerhalb des Fensters handelt es sich um vollständige Zellen.



**Abbildung 4-3 CD3/vital stain gegen CD14-Darstellung.** Innerhalb des grauen Fensters befinden sich die lebenden Zellen. Die toten Zellen leuchten im Kanal FL6 eine log-Stufe höher. Im linken oberen schwarzen Fenster befinden sich die CD3-positiven, CD14-negativen T-Zellen. Im rechten unteren schwarzen Fenster die CD14-positiven, CD3-negativen Monozyten.

Mit dem ersten Fenster (Abbildung 4-2) wurden Zelltrümmer ausgeschlossen. In dem zweiten Fenster (Abbildung 4-3, graues Fenster) wurden nur die lebenden Zellen eingeschlossen. Die toten Zellen, die mit Sytox® blue angefärbt wurden, leuchteten im Kanal FL6 ca. eine log-Stufe heller als die mit BD Horizon® V450 markierten CD3-positiven Zellen. Die dritte Einstellung (Abbildung 4-3) diente zur Abgrenzung der T-Lymphozyten, Monozyten, sowie der Gruppe der B-Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen. Dabei konnten die Monozyten über ihre CD14-Positivität definiert werden. CD14 wurde mit einem PerCP-konjugierten Antikörper gefärbt und leuchtete daher im Kanal FL3. T-Lymphozyten sind CD3-positiv. CD3 wurde über einen BD Horizon® V450-gekoppelten Antikörper detektiert, welches im Kanal FL6 gemessen wurde. B-Lymphozyten und NK-Zellen sind weder CD14, noch CD3 positiv. Daher befanden sie sich im unteren linken Quadranten der Darstellung CD3 auf CD14 (hier nicht gezeigt).

Das Fluorescence Activated Cell Sorting® (FACS®) beruht auf der Grundlage der Durchflusszytometrie. Das Prinzip ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Dazu müssen die vereinzelter Zellen nach der Analyse anhand ihrer Eigenschaften markiert werden. Je nach den gewählten Eigenschaften werden die Zellen entweder mit positiven oder negativen Ladungen markiert bzw. überhaupt nicht markiert. Durch die entsprechende Ladung kann der Tropfen, der jeweils eine Zelle enthält, in eine gewünschte Richtung abgelenkt und somit in ein bestimmtes Gefäß gleitet werden. Das verwendete Durchflusszytometer kann in bis zu fünf verschiedene Gefäße sortieren. Dabei werden die Tropfen von stark positiv bis stark negativ mit den Zwischenstufen schwach positiv, neutral und schwach negativ aufgeladen.



**Abbildung 4-4 Prinzip Durchflusszytometrie und FACS®<sup>80</sup>**

Die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen werden, von einem Hüllstrahl umgeben, in der Kapillare der Messküvette vereinzelt und von einem Laserstrahl getroffen. Anhand der Intensität des vorwärts (englisch: forward scatter) und seitwärts (englisch: side scatter) gestreuten Lichtes können Aussagen über die Größe (forward scatter), Granularität (side scatter) der einzelnen Zellen getroffen werden. Außerdem kann mit Hilfe der Intensität des emittierten Lichtes bestimmter Wellenlängen die Dichte des fluoreszenzmarkierten Antikörpers auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Beim FACS® werden die Zellen nach der Analyse mit einer vorgegebenen elektrischen Ladung versehen und in die entsprechenden Gefäße sortiert.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Protokolls erläutert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die verbliebenen 900 µl der Zellsuspension wurden nach der Entnahme von 100 µl der unsortierten Zellen bei 350 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Anschließend wurden die Antikörper zu dem Pellet gegeben und mit diesem resuspendiert. Es wurden jeweils 10 µl der Antikörper dazu gegeben und mit den Zellen 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem ml PBS gewaschen und in 400 µl PBS aufgenommen.

Unmittelbar vor dem Sortieren wurde der Probe ein µl Sytox® Blue Dead Cell Stain hinzugefügt. Es wurden jeweils 300 µl pegGOLD® Trifast vorgelegt und

<sup>80</sup> Fuchs

die Zellen direkt hier hinein sortiert, um eine möglichst große RNA-Ausbeute zu erhalten.

#### **4.2.3 RNA-Extraktion**

Die folgenden Schritte wurden ebenfalls ausschließlich auf Eis durchgeführt.

Die sortierten Zellen wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße mit weiteren 700 µl Trifast überführt. Dann wurden unter dem Abzug 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Gefäße anschließend 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und für sieben Minuten stehen gelassen. Daraufhin fand eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 12000 g und 4°C statt. Nach der Zentrifugation ließen sich zwei Phasen erkennen. Die untere Phase enthielt das Trifast, welches je nach Charge eine rosa oder gelbe Färbung hatte. In der oberen farblosen Phase befand sich die RNA in einer wässrigen Lösung. Diese obere Phase wurde ab pipettiert und in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden dann 0,5 ml Isopropanol gegeben. In diesem Zustand konnte die RNA bei -80°C eingefroren und für einige Zeit gelagert werden. Entweder nach dem Auftauen oder direkt im Anschluss, wurde nun ein µl Glykogen dazu gegeben. Dieses hilft, bei kleinen RNA-Mengen das entstehende Pellet besser zu erkennen. Dann wurde alles für zehn Minuten stehen gelassen und anschließend bei 12.000 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte der Isopropanolüberstand vorsichtig ab pipettiert werden, wobei das Pellet möglichst trocken werden sollte. Es schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit einem ml 75%igem Ethanol und zehn minütiger Zentrifugation mit 12.000 g bei 4°C an. Abschließend sollte das RNA Pellet kurz an der Luft getrocknet und zum Schluss in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst werden. Die extrahierte RNA konnte dann bei -80°C gelagert werden. Die Konzentration der gewonnen RNA wurde am Spektralphotometer bei 260nm bestimmt.

#### **4.2.4 cDNA Synthese**

Um eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels quantitativer PCR (qPCR) vorzunehmen, muss die mRNA zunächst in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies geschieht mithilfe des Enzyms Reverse

Transkriptase (RT) unter Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs).

Hier wurde für die cDNA-Synthese das Omniscript® RT-Kit von Qiagen® verwendet. Dabei wurden je ein µg der RNA pro Probe eingesetzt. Die RNA wurde je nach Konzentration mit RNase-freiem Wasser verdünnt, so dass jeweils zwölf µl RNA-Lösung vorlagen. Bei gering konzentrierter RNA wurden maximal zwölf µl der RNA-Lösung verwendet. Dazu wurden acht µl des Mastermixes in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben. Der Mastermix wurde laut Protokoll wie folgt angesetzt. Pro Probe jeweils:

- 2 µl 10x RT-Puffer
- 2 µl dNTP-Mix (5 µM)
- 2 µl Hexamer-Primer (100 µM)
- 0,75 µl RNase-freies Wasser
- 0,25 µl RNasin - Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µl Omniscript® RT

Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C im Heizblock. In dieser Zeit fand die Synthese der cDNA statt. Anschließend musste die Reverse Transkriptase für fünf Minuten bei 93°C hitzeinaktiviert werden. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **4.2.5 Quantitative PCR**

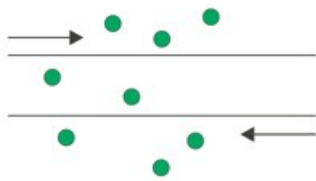
Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) stellt eine Erweiterung des Prinzips der einfachen PCR dar. Bei der einfachen PCR wird eine gewünschte DNA-Sequenz vervielfacht. Dies geschieht mit Hilfe einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Diese synthetisiert ausgehend von den eingesetzten Primern in 5'-3'-Richtung je einen komplementären DNA-Strang zu den beiden vorhandenen DNA-Strängen. Die Primer bestimmen dabei welcher Abschnitt der DNA amplifiziert wird. Die Primer müssen so gewählt werden, dass sie die gewünschte DNA-Sequenz flankieren, wobei jeweils ein Primer zu einem der beiden Stränge komplementär sein muss. Zunächst muss die DNA in ihre Einzelstränge getrennt werden. Dies geschieht durch Hitzeeinwirkung. In einem nächsten Schritt können sich dann die hinzugegebenen Primer an die DNA in dem zu ihnen jeweils komplementären Teil anlagern. Dieser Schritt wird als



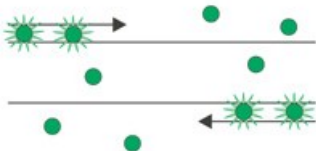
„Annealing“ bezeichnet und findet bei einer bestimmten, von den jeweiligen Primern abhängigen, Temperatur statt. Diese wird zuvor in einer sog. Gradienten-PCR ermittelt bei der verschiedene Temperaturen verglichen werden. Die Temperatur bei der das beste Amplifikationsergebnis erzielt wurde, wird in der qPCR angewandt. Im Anschluss an das Annealing kann die Polymerase mit der Synthese der neuen DNA-Stränge beginnen (Elongation). Nach einer kurzen Zeit wird die Temperatur erneut erhöht, so dass die Elongation beendet und die DNA-Stränge wieder getrennt werden. Damit beginnt ein weiterer Zyklus. Die Anzahl der PCR-Produkte steigt im Verlauf exponentiell an, da auch die neu synthetisierte DNA als Vorlage (englisch template) dient. Durch die hitzebeständige DNA-Polymerase, welche aus Bakterien, deren natürlicher Lebensraum in heißen Thermalquellen liegt, gewonnen wird, ist es möglich diese Zyklen hintereinander in einem Thermocycler durchlaufen zu lassen.

### a SYBR Green I

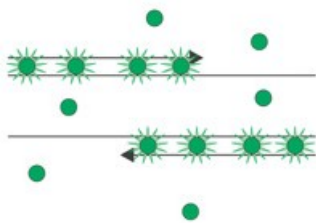
Annealing phase



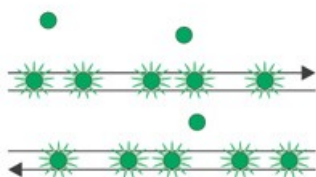
Extension phase (I)



Extension phase (II)



End of PCR cycle



**Abbildung 4-5 Prinzip der quantitativen PCR mit Sybr-Green®<sup>81</sup>**

Der Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green® lagert sich in doppelsträngiger DNA ein. Die Intensität der Fluoreszenz wird dadurch verstärkt, so dass die Intensität mit der Menge an doppelsträngiger DNA korreliert .

Bei der qPCR wird die einfache PCR dahin gehend erweitert, dass mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge vorgenommen werden kann. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen® lagert sich in die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge ein und bekommt dadurch eine stärkere Fluoreszenz. Die gemessene Fluoreszenz

<sup>81</sup> van der Velden et al. 2003

korreliert mit der Menge an entstandenem PCR-Produkt. Die Messung muss in der exponentiellen Phase der Amplifikationszyklen stattfinden, da hier ein optimales Verhältnis zwischen vorgelegten Substraten, Enzym und Reaktionsprodukt besteht. Bestimmt wird jeweils der sog. „threshold cycle“ (CT). Damit ist derjenige PCR-Zyklus gemeint, in dem die Fluoreszenz das erste Mal über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und somit der Bereich der exponentiellen Amplifikation erreicht ist. Der CT-Wert ist demnach von der Menge der zu amplifizierenden DNA, welche zu Beginn eingesetzt wurde und somit von der Genexpression abhängig. Um eine Auswertung vornehmen zu können, muss eine Standardkurve zur Normierung erstellt werden. Diese Standardkurve wird mithilfe einer Verdünnungsreihe von cDNA erstellt. Diese cDNA muss von Zellen stammen, in denen das gesuchte Gen stark exprimiert wird, um auch bei einer hohen Verdünnung der cDNA noch eine valide Messung zu erhalten.

Die Primerpaare für B4GALT1 mussten zunächst mit einer Gradienten-PCR etabliert werden. Dabei werden verschiedene Annealing-Temperaturen verglichen, um die optimale zu finden. Die vom Hersteller empfohlene Temperatur lag bei 57,9°C für den linken Primer und bei 59,7°C für den rechten. Die Gradienten-PCR wurde mit den Temperaturen 60°C, 58,8°C, 57,7°C und 56,3°C durchgeführt. Es ergab sich eine optimale Temperatur von 59°C.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden Zellen gesucht, die B4GALT1 hoch exprimieren. Dazu wurde cDNA von OCI-, HL60- und KG1A- Zellen verglichen. Beides wurde zusammen in einem PCR-Ansatz durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

In jedes Reaktionsgefäß wurden ein µl cDNA, sowie 24 µl des Mastermixes gegeben. Der Mastermix wurde laut Protokoll des Qiagen® Kits wie folgt angesetzt:

- 16,875 µl doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O)
- je 1,25 µl des B4GALT1 left und right Primers der Konzentration 100 pmol/µl
- 2,0 µl dNTPs (10mM)
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 0,125 µl AmpliTaq® Polymerase (5u/µl)

Die Polymerase wurde als letztes dazu gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und in den Thermocycler überführt.

Folgendes Protokoll wurde am Thermocycler eingestellt:

94°C – 2,5 Minuten

94°C – 30 Sekunden

55°C – 30 Sekunden

72°C – 30 Sekunden

94°C – 30 Sekunden

x 21 Zyklen

60°C – 5 Minuten

4°C – ∞

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen. Dazu wurden 3 g Agarose in 100 ml TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE)-Puffer unter Erwärmung gelöst. Außerdem wurden 14 µl Ethidiumbromid zum Färben der DNA und damit Sichtbarmachung der Banden unter Einhaltung der Sicherheitsvorschriften zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und zum Erkalten unter dem Abzug stehen gelassen. Nach dem Auftragen der PCR-Produkte und einem 123 bp-Marker in die Geltaschen, lief die Gelelektrophorese bei ca. 100mV für ca. 45 Minuten.

Für die qPCR wurden in einer 96-Well-Platte in jedes Well 24 µl des Mastermixes vorgelegt und ein µl cDNA dazu gegeben. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Hälfte der Platte wurde mit dem Mastermix für B4GALT1, die andere mit demjenigen für ABL beladen. Außerdem wurden auf jeder Platte pro Gen einmal KG1A-cDNA als Standard, sowie eine Negativkontrolle, beide jeweils in Doppelbestimmung, mitgeführt.

Der Master Mix enthielt pro Ansatz auf einen µl cDNA:

-12,5 µl SYBR Green® Mastermix

-Je 0,75 µl der Primer

-10,0 µl ddH<sub>2</sub>O

Das Thermocyclerprotokoll sah folgendermaßen aus:

95°C – 15 Minuten	
94°C – 15 Sekunden	x 45 Zyklen
59°C – 30 Sekunden	
72°C – 30 Sekunden	
95°C – 10 Sekunden	
4°C – ∞	

Die IL10-qPCR wurde analog zu den oben beschriebenen Schritten durchgeführt. Die Etablierung der Primer mittels einer Gradienten-PCR war wie oben beschrieben erfolgt. Die ermittelte optimale Annealing-Temperatur lag bei 60°C. Zur Bestimmung der Zellen für die Erstellung der Standardkurve wurde die cDNA von HL-60, KG1A und aus eigenen Leukozyten gewonnene cDNA verglichen. Die Standardkurve wurde analog zu der oben beschriebenen für B4GALT1 erstellt. Die aus den eigenen Leukozyten gewonnene cDNA wurde letztlich als Standard bei den einzelnen qPCR-Platten mitgeführt. Als Haushaltsgen wurde ebenfalls ABL eingesetzt. Mit der entsprechenden Annealing-Temperatur sah das Thermocycler-Protokoll folgendermaßen aus:

95°C – 15 Minuten	
94°C – 15 Sekunden	x 45 Zyklen
60°C – 30 Sekunden	
72°C – 30 Sekunden	
95°C – 10 Sekunden	
4°C – ∞	

#### 4.2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Durchflusszytometrie wurde mit der FlowJo® 7.6 Software vorgenommen. Ausreißer wurden mit dem Test nach Grubbs detektiert und ausgeschlossen. Alle Daten wurden in die GraphPad® Prism 5.01 Software transferiert. Mit Hilfe dieser Software wurden alle weiteren Berechnungen durchgeführt. Zum Vergleich der Gruppen wurden Mann-Whitney und einseitige Anova Testungen angewandt. Es wurde ein 5%-Signifikanzniveau zugrunde gelegt. Die Werte für die B4GALT1-Expression auf T-Zellen, sowie für den IPF-score wurden weiterhin einer Kaplan-Meier Analyse mitsamt log-rank Test

zugeführt. Dazu wurden die Daten entlang des Mittelwerts der B4GALT1-Expression in zwei Gruppen unterteilt: je eine Gruppe der Patienten mit einer Expression kleiner und größer als der Mittelwert.

Frau Prof. Nina Timmesfeld von dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg führte univariate und multivariate Cox Regressionsanalysen für die Expressionen der untersuchten Oberflächenmoleküle durch, um die prognostische Relevanz der Marker in Bezug auf das RFS (relapse free survival, deutsch: rezidivfreies Überleben) zu ermitteln. Dazu wurden die Werte logarithmisch transformiert, da einige Werte positiv asymmetrisch waren. Für die multivariate Analyse wurden als Kovariablen der IPF-score, sowie die Anzahl der Transplantationen verwendet, um einen Einfluss der Marker unabhängig von dem Einfluss der beiden genannten Variablen nachzuweisen. Beide Parameter haben nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf das Überleben der Patienten<sup>82,83</sup>. Die Analysen wurden mit der statischen Analysesoftware R® (Version 3.2.3) durchgeführt.

---

<sup>82</sup> Lorch et al. 2012

<sup>83</sup> Lorch et al. 2010

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse des Patientenkollektivs

Ziel dieser Arbeit war die Einflüsse der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen besser zu verstehen. Dieser Zusammenhang wurde an Leukozyten von Hodentumorpatienten untersucht. Insgesamt konnten 46 Patientenproben von den 73 behandelten Patienten analysiert werden. Von den anderen Patienten waren entweder keine Rückstellproben, keine ausreichenden Informationen über den Krankheitsverlauf verfügbar oder nach dem Auftauen befanden sich keine intakten Zellen in der Probe. Die Patienten wurden anhand des weiteren Krankheitsverlaufs in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bestand aus denjenigen Patienten, die im weiteren Verlauf kein Rezidiv der Hodentumorerkrankung erlitten haben. Der Beobachtungszeitraum endete im März 2015. Bis dahin hatten 27 Patienten kein Rezidiv bekommen, wobei sich das rezidivfreie Intervall (RFI) der Patienten je nach Therapiezeitpunkt in seiner Länge unterschied. Das kürzeste RFI in dieser Gruppe lag bei 15, das längste bei 168 Monaten. Im Mittel betrug das RFI 90 Monate. Die zweite Gruppe enthielt Patienten mit Spätrezidiv, wobei dieses hier als Rezidiv mehr als sechs Monaten nach autologer Stammzelltransplantation definiert wurde. Im Mittel erlitten die Patienten nach 11,6 Monaten ein Rezidiv. Diese Gruppe umfasste neun Patienten. Des Weiteren wurde die Gruppe der Patienten mit Frührezidiv abgegrenzt. Dieses wurde definiert als Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Stammzellgabe, wobei hier im Mittel nach 4,1 Monaten ein Rezidiv auftrat. In dieser Gruppe wurden zehn Patienten erfasst. Die Struktur der Patientendaten wurde hinsichtlich Alter und der Anzahl der durchgeführten Stammzelltransplantationen untersucht. Die Analyse der Patientendaten ist in den Tabellen 5-1 und 5-2 (s.u.) zusammen gefasst. Außerdem wurde der IPF-Score nach Lorch et al.<sup>84</sup> für 41 der 46 Patienten ermittelt. Für die übrigen Patienten standen Informationen für einige Parameter nicht zur Verfügung, so dass der Punktwert hier nicht berechnet werden konnte. Dieses Punktesystem zur Prognoseabschätzung umfasst sieben Kriterien. Diese sind der Ort der Tumorerstmanifestation, das Ansprechen auf die first-line Therapie, das initiale

---

<sup>84</sup> Lorch et al. 2010

progressionsfreie Intervall, die Höhe der Tumormarker Alpha-Fetoprotein (AFP) und  $\beta$ -Kette des humanen Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) zum Zeitpunkt der salvage-Therapie, das Vorhandensein von Leber-, Knochen- oder Hirnmetastasen, sowie die Histologie.

	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Alter</b> Mittelwert (Min;Max)	<b>IPF-Score</b> Mittelwert (Min;Max)	<b>Follow-up Intervall</b> Mittelwert (Min;Max) [Monate]	<b>Anzahl der HDCT/SZT</b> Mittelwert (Min;Max)
<b>Kein Rezidiv</b>	27	38.4 (20;62)	1.0 (0;3)	90.0 (15;168)	2.4 (1;3)
<b>Spät-rezidiv</b>	9	37.3 (26;43)	1.1 (0;2)	11.6 (8;22)	1.9 (1;3)
<b>Früh-rezidiv</b>	10	36.6 (21;55)	1.6 (1;3)	4.1 (1;6)	1.9 (1;3)

**Tabelle 5-1 Patientenkollektiv gruppiert nach dem Rezidivzeitpunkt**

Abkürzungen: IPF-score: Punktesystem der „International prognostic factor study group“, HDCT: Hochdosischemotherapie, SZT: Stammzelltransplantation

<b>IPF-Score</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Alter</b> Mittelwert (Min;Max)	<b>Histologie</b>
0	10	43.7 (34;62)	6 S 4 NS
1	17	37.4 (23;58)	1 S 16 NS
2	12	34.6 (20;49)	0 S 12 NS
3	2	40	0 S 2 NS

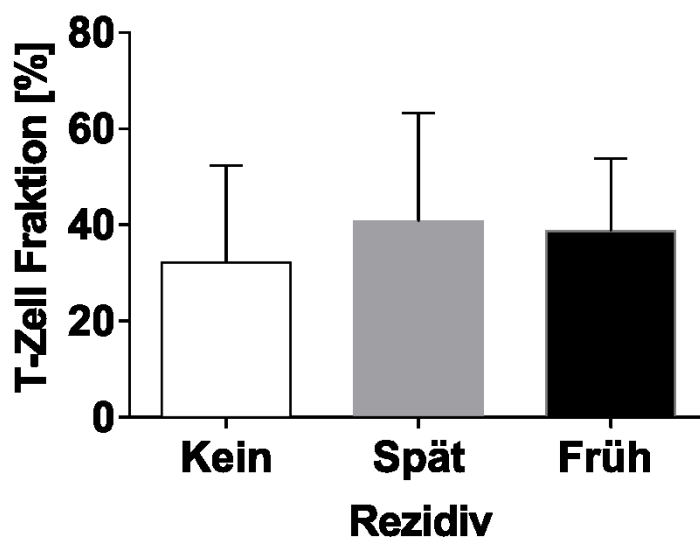
**Tabelle 5-2 Patientenkollektiv gruppiert nach dem IPF-Score**

Abkürzungen: IPF-score: Punktesystem der „International prognostic factor study group“, S: Seminom, NS: Nicht-Seminom

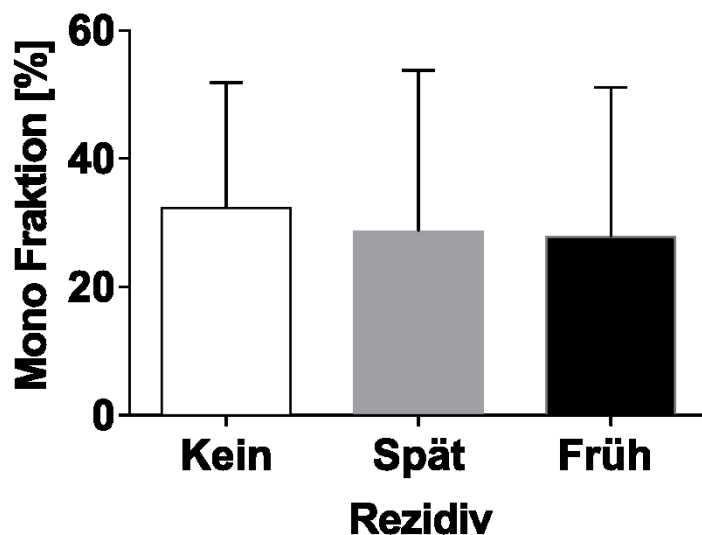


## 5.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung von Oberflächenmolekülen

Um zu untersuchen, inwieweit eine unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen auf Immunzellen bei Hodentumorpatienten einen Effekt auf die Tumorkontrolle im Sinne der Rezidiv-Wahrscheinlichkeit und -latenz hat, wurden drei Oberflächenmoleküle ausgewählt, welche an der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Diese wurden mithilfe von Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und darüber ihre Expression durchflusszytometrisch gemessen. Außerdem wurden die Leukozytenpopulationen der T-Zellen, sowie der Monozyten voneinander abgegrenzt. Der Anteil der jeweiligen Zellpopulation an allen lebenden Zellen ist in den Abbildungen 5-1 und 5-2 dargestellt.



**Abbildung 5-1 Anteil der T-Lymphozyten an allen lebenden Zellen für die drei Gruppen Kein-, Spät- und Frührezidiv.** Die Fraktion der T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den drei Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,4699$ ).



**Abbildung 5-2 Anteil der Monozyten an allen lebenden Zellen für die drei Gruppen Kein-, Spät- und Frührezidiv.** Die Fraktion der Monozyten unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den drei Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,8304$ ).

### 5.2.1 CD31

CD31, auch PECAM1 genannt, ist an der Leukozytenadhäsion und -migration beteiligt<sup>85</sup> und kann Apoptose unterdrücken<sup>86</sup>. In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine hohe Expression in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose gebracht werden<sup>87,88,89</sup>.

CD31 wurde mithilfe eines Alexa Fluor® 488 konjugierten Antikörpers markiert und die mittlere Fluoreszenz jeder Zelle im Kanal 1 des Durchflusszytometers gemessen. Diese korreliert mit der Expression von CD31 auf der Zelle.

Die Auswertung wurde mittels der FlowJo® 7.6 Software vorgenommen. Dabei wurde die Fluoreszenz zwischen den Gruppen Kein, Früh- und Spätrezidiv mittels einseitiger Anova- und Mann-Whitney-Testung verglichen. Zwischen den drei Gruppen Kein, Früh- und Spätrezidiv konnte sowohl in der Population der Monozyten, als auch der T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied der CD31- Expression festgestellt werden. Auch bei gemeinsamer Auswertung der

<sup>85</sup> Alevizos et al. 2012

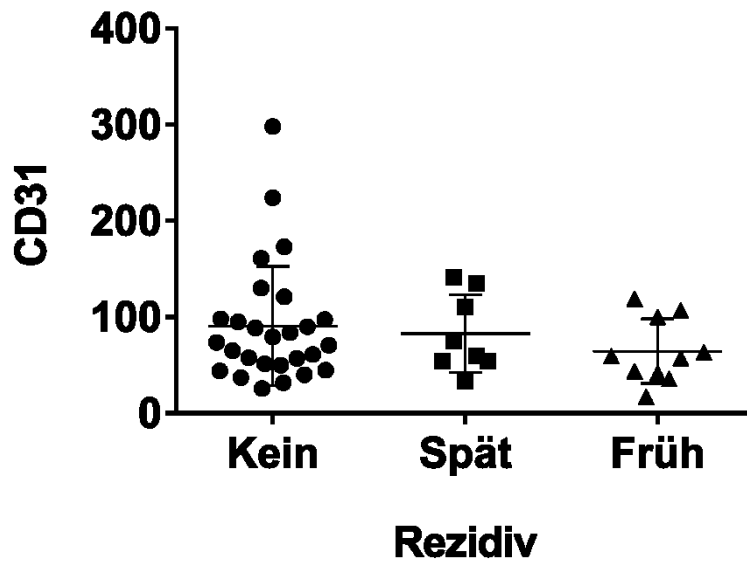
<sup>86</sup> Gao et al. 2003

<sup>87</sup> Alevizos et al. 2012

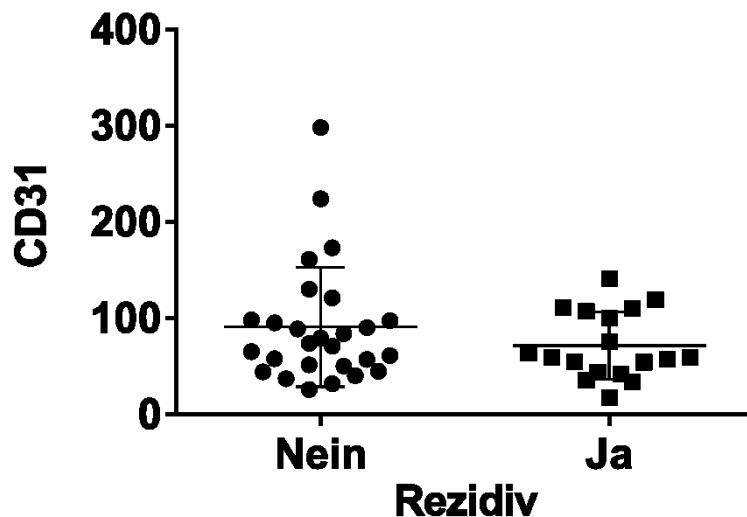
<sup>88</sup> Bergom et al. 2005

<sup>89</sup> Jackson et al. 2000

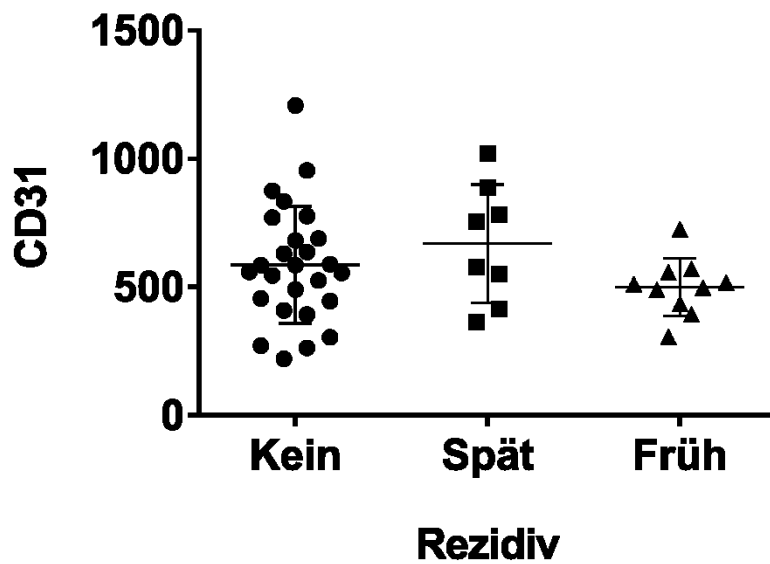
beiden Rezidivgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildungen 5-3 bis 5-6).



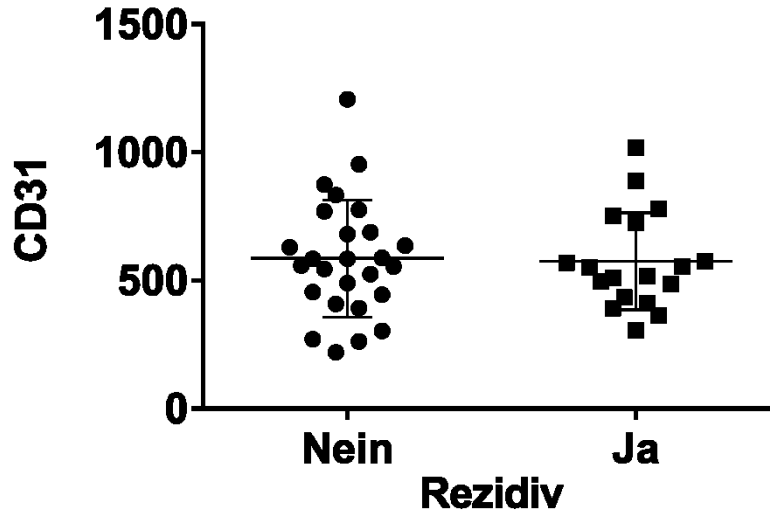
**Abbildung 5-3** Höhe der PECAM-1-Expression auf T-Lymphozyten. Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,4287$ ).



**Abbildung 5-4** Höhe der PECAM-1-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,4554$ ).



**Abbildung 5-5 Höhe der PECAM-1-Expression auf Monozyten.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,4675$ ).



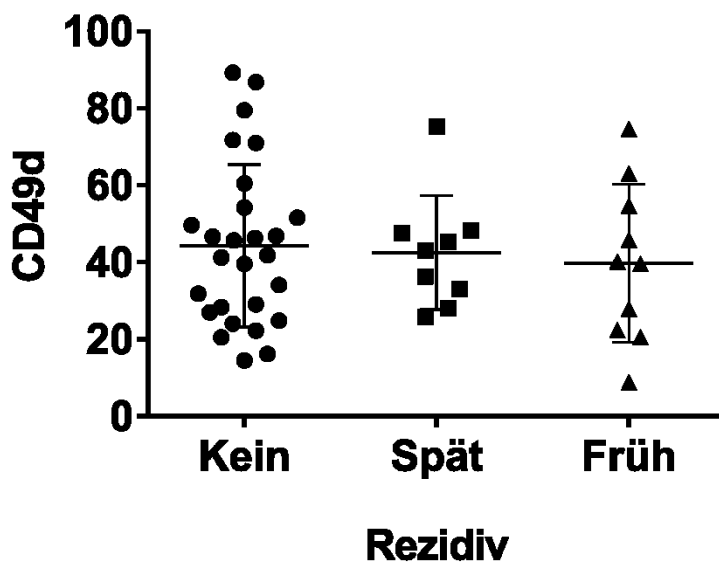
**Abbildung 5-6 Höhe der PECAM-1-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,7364$ ).

### 5.2.2 CD49d

CD49d, auch VLA-4 genannt, spielt eine Rolle bei dem Anheften von hämatopoetischen Vorläuferzellen in das Knochenmark<sup>90,91</sup>, sowie an Orte, an denen Angiogenese stattfindet<sup>92</sup>. Außerdem scheinen CD49d tragende Zellen an der Schaffung einer geeigneten Umgebung für die Bildung von Metastasen beteiligt zu sein<sup>93</sup>.

Mit einem APC-konjugierten Antikörper wurde CD49d auf den Zellen markiert und anschließend seine Fluoreszenz im Kanal 8 gemessen. Die Auswertung fand analog zu der von CD31 wie oben beschrieben statt.

Zwischen den Gruppen Kein, Früh- und Spätrezidiv, sowie bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder auf Monozyten, noch T-Lymphozyten (Abbildungen 5-7 bis 5-10).



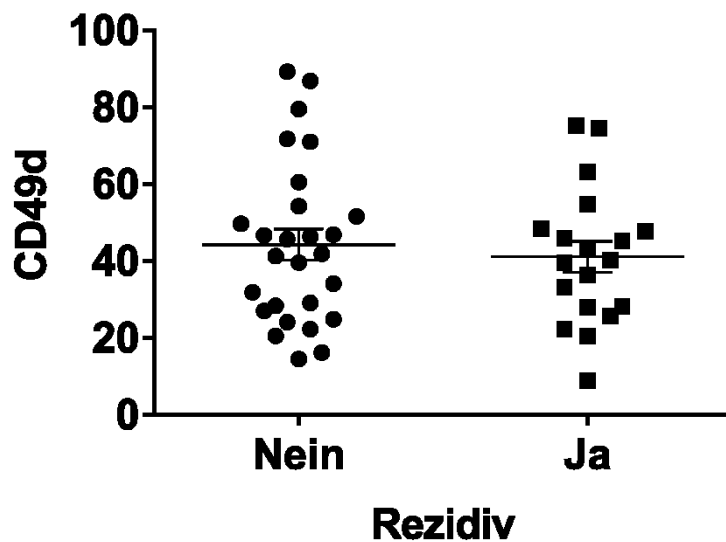
**Abbildung 5-7 Höhe der VLA-4-Expression auf T-Lymphozyten.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,8276$ ).

<sup>90</sup> Papayannopoulou et al. 2001

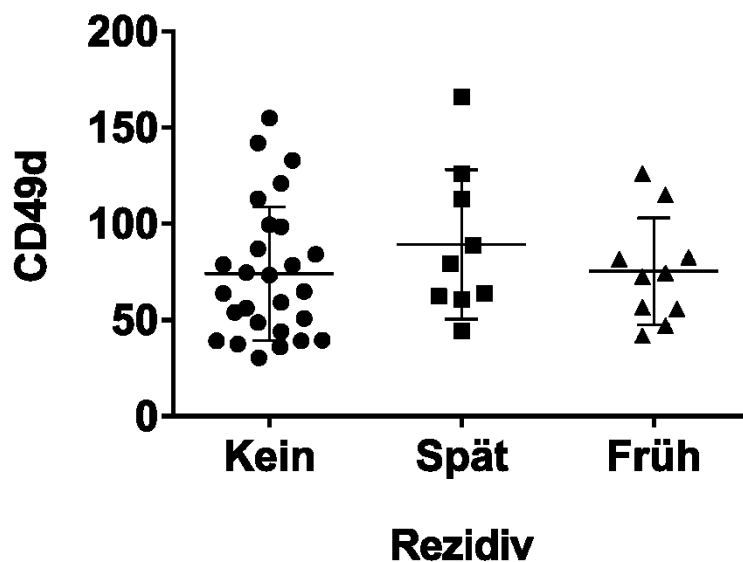
<sup>91</sup> Papayannopoulou et al. 1995

<sup>92</sup> Jin et al. 2006

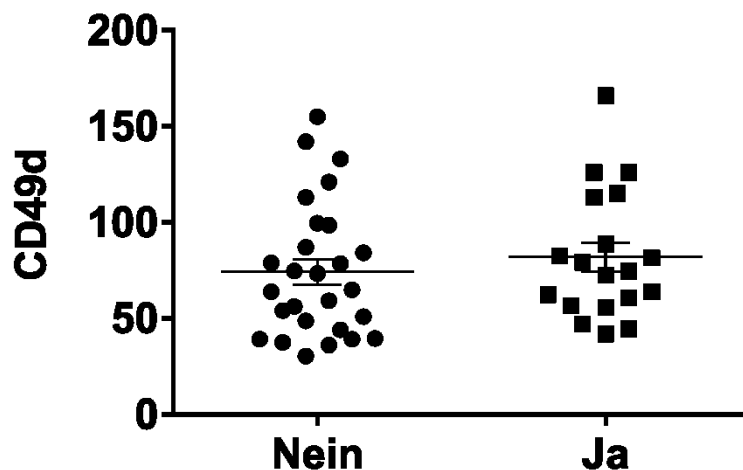
<sup>93</sup> Kaplan et al. 2005



**Abbildung 5-8** Höhe der VLA-4-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,7362$ ).



**Abbildung 5-9** Höhe der VLA-4-Expression auf Monozyten. Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,5069$ ).



**Abbildung 5-10 Höhe der VLA-4-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,3269$ ).

### 5.2.3 CD184

CD184, auch CXCR4 genannt, stellt den Rezeptor für CXCL12 dar und ist vermehrt in Tumorgewebe zu finden<sup>94</sup>. Er spielt eine Rolle als Stimulator für die Tumorzellmigration<sup>95,96,97,98</sup>.

Nachgewiesen wurde die Expression von CD184 über eine Bindung an einen PE-gekoppelten Antikörper. Die Fluoreszenz der Zellen wurde im Kanal 2 gemessen und die Auswertung analog zu den oben beschriebenen vorgenommen.

So wie bereits für CD31 und CD49d konnte auch für CD184 kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Patientengruppen gefunden werden (Abbildungen 5-11 bis 5-14).

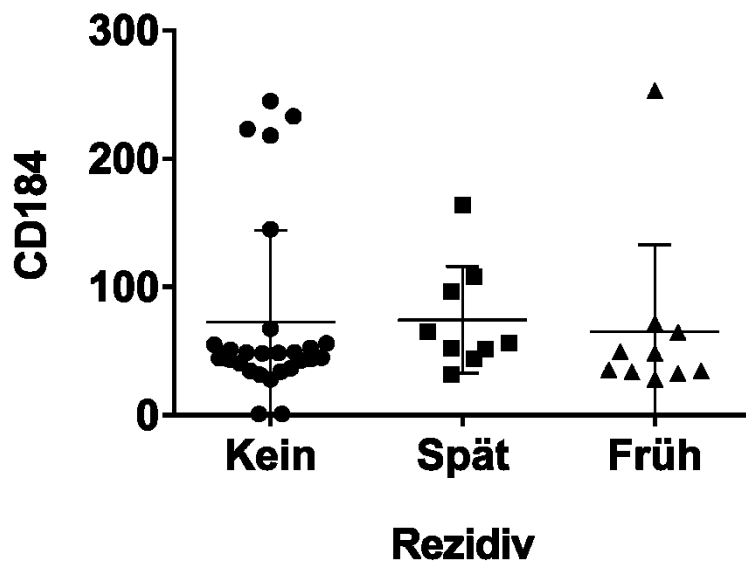
<sup>94</sup> Balkwill 2004b

<sup>95</sup> Balkwill 2004a

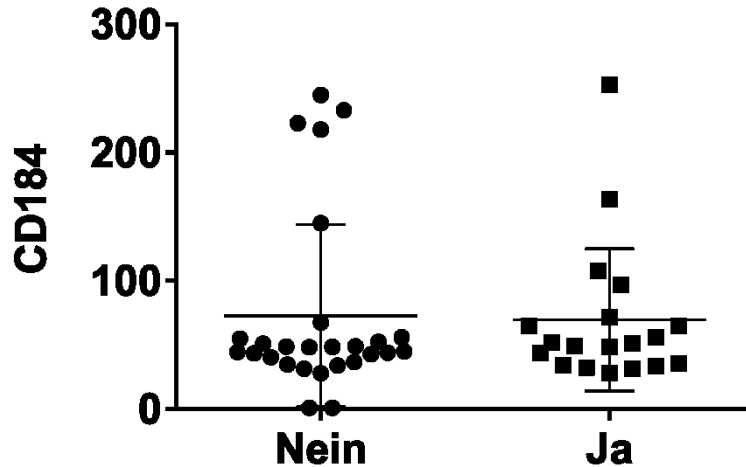
<sup>96</sup> Balkwill 2004b

<sup>97</sup> Müller et al. 2001

<sup>98</sup> Scala et al. 2006

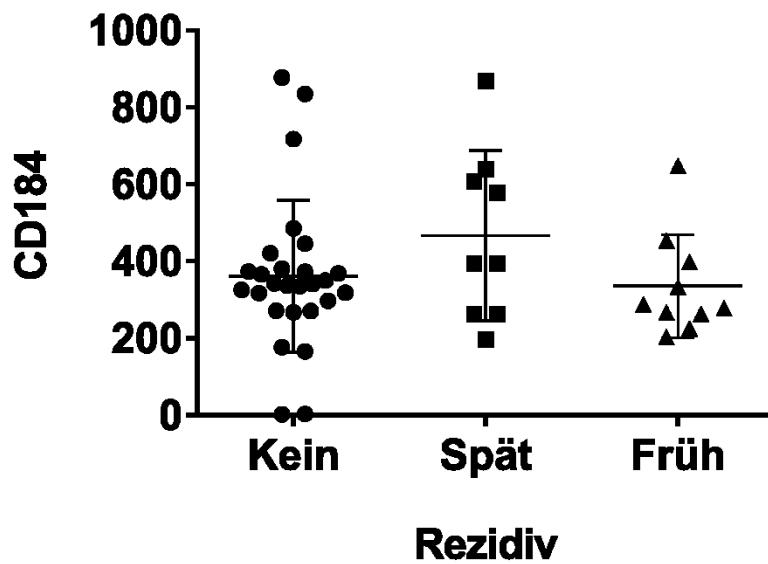


**Abbildung 5-11 Höhe der CXCR4-Expression auf T-Lymphozyten.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,9411$ ).

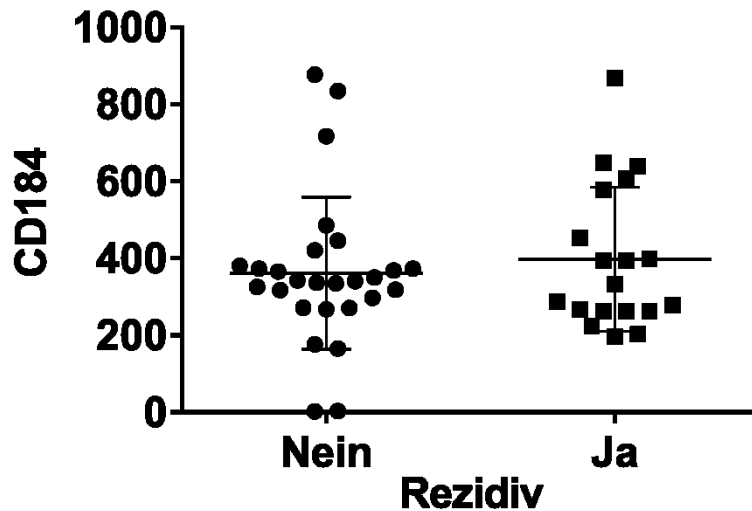


**Abbildung 5-12 Höhe der CXCR4-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,5920$ ).





**Abbildung 5-13 Höhe der CXCR4-Expression auf Monozyten.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,2781$ ).



**Abbildung 5-14 Höhe der CXCR4-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,9252$ ).

### **5.3 Quantitative PCR**

Die Expressionen von B4GALT1 und IL10 wurden auf RNA-Ebene in den vorliegenden Leukaphereseproben von Hodentumorphpatienten untersucht. Die Auswertungen wurden mithilfe einer Kombination aus Standardkurve und  $\Delta\Delta C_t$ -Methode vorgenommen. Zur Normierung wurde das Haushaltsgen ABL eingesetzt.

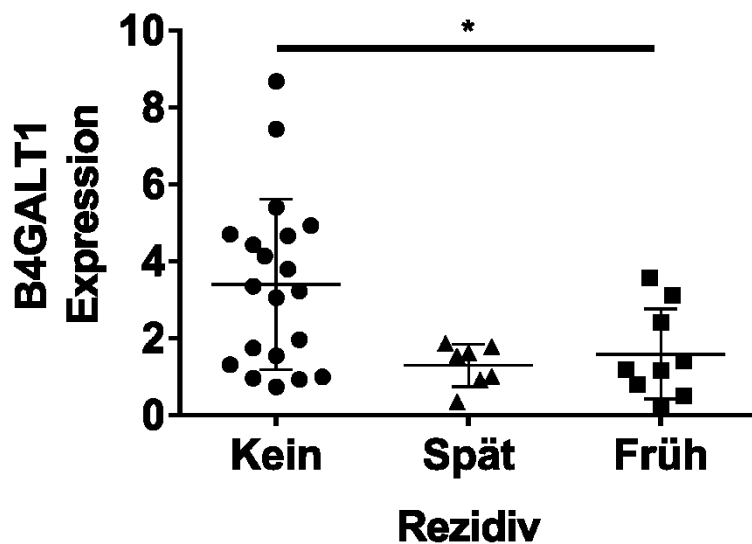
#### **5.3.1 B4GALT1**

B4GALT1 ist eine membrangebundene Galactosyltransferase, die den Zucker UDP-Galactose auf weitere Zuckerreste überträgt und dadurch die Zelloberfläche verändert. Mittels qPCR wurde das Expressionsniveau für B4GALT1 in den Monozyten und T-Lymphozyten, sowie den unsortierten mononukleären Zellen der Patienten ermittelt.

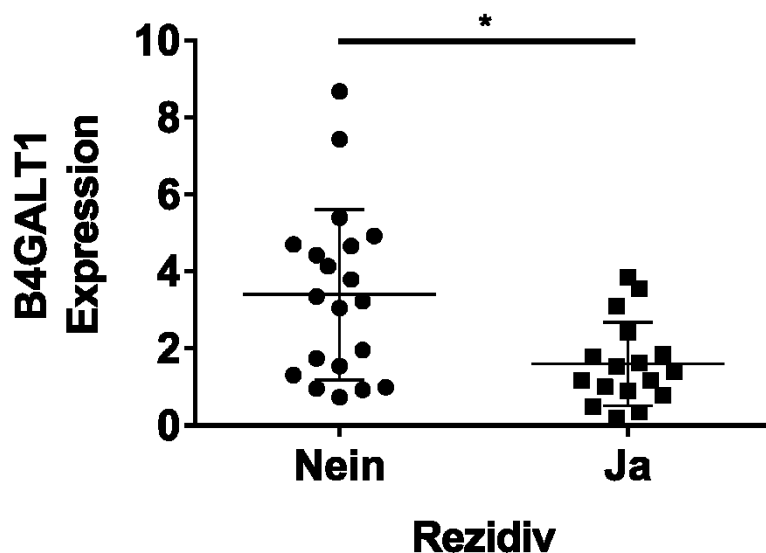
Zur Erstellung der Standardkurve musste eine Zelllinie gefunden werden, die B4GALT1 in hohem Maße exprimiert. Dazu wurden die Zelllinien OCI, HL60 und KG1A verglichen. Dabei stellten sich die KG1A-Zellen als am geeignetsten heraus. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe der KG1A-cDNA verwendet. Es wurden die Verdünnungen 1:5000, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50 und 1:10, sowie die unverdünnte cDNA eingesetzt. Die unverdünnte KG1A-cDNA wurde bei jeder weiteren qPCR als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Genexpression auf mRNA-Ebene sollte für Monozyten und T-Lymphozyten, sowie die unsortierten mononukleären Zellen, jeweils im Vergleich zwischen den drei Patientengruppen kein Rezidiv, Frührezidiv und Spätrezidiv, sowie im Vergleich der rezidivfreien Gruppe mit einer gemeinsamen Rezidivgruppe beurteilt werden.

Für die T-Lymphozyten konnte ein signifikanter Unterschied in der B4GALT-Expression sowohl im Vergleich der drei Gruppen Kein-, Spät- und Frührezidiv (Abbildung 5-15), als auch bei der gemeinsamen Auswertung der Rezidivgruppen (Abbildung 5-16) gezeigt werden. Die Expression von B4GALT1 lag signifikant höher bei denjenigen Patienten, die kein Rezidiv erlitten haben. Der p-Wert für den Vergleich der drei Gruppen mittels eines einseitigen Anova-Tests war 0,0105. Für den Vergleich der zwei Gruppen ergab der Mann-Whitney-Test einen p-Wert von 0,0080.



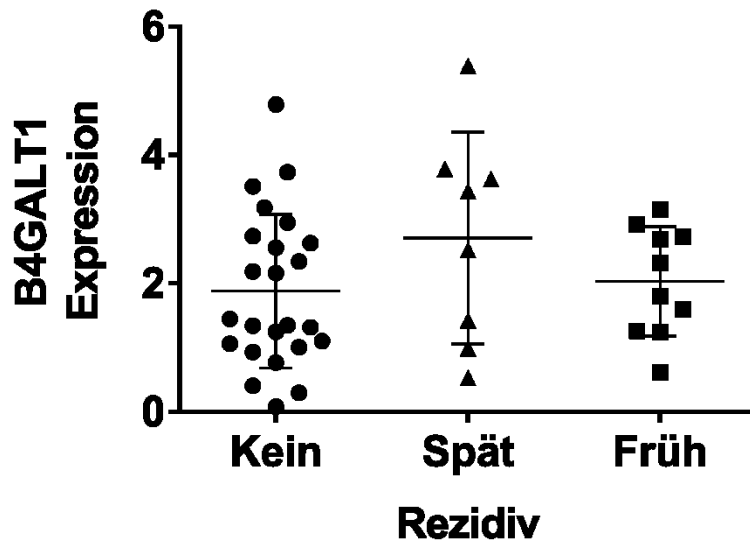
**Abbildung 5-15 RNA-Expression von B4GALT1 in T-Lymphozyten.** Die mittels qPCR bestimmte Expression von B4GALT1 ist signifikant höher in den T-Zellen der Patienten, die kein Rezidiv erlitten haben (einseitiger ANOVA-Test,  $p = 0,0105$ ).



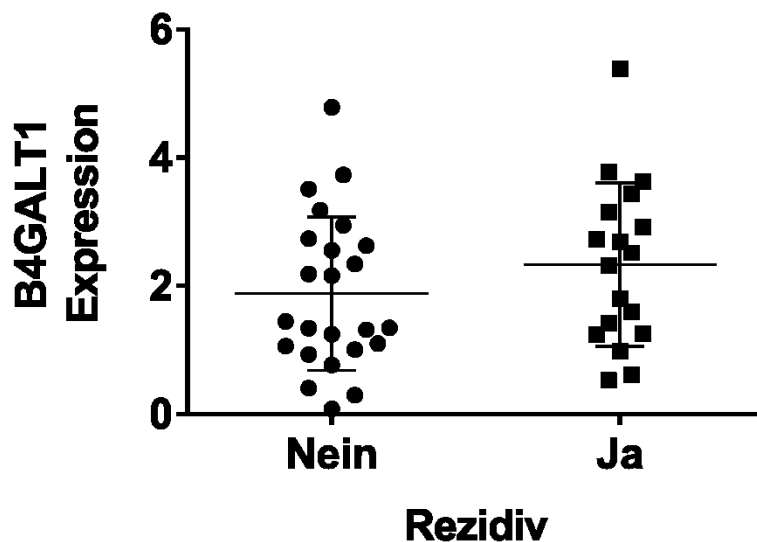
**Abbildung 5-16 RNA Expression von B4GALT1 in T-Lymphozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die mittels qPCR bestimmte B4GALT1 Expression ist bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen ebenfalls signifikant höher in der Patientengruppe ohne Rezidiv (Mann-Whitney-Test,  $p = 0,0080$ ).

Bei den Monozyten hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden (Abbildung 5-17). Auch bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen wurde kein signifikanter

Unterschied nachgewiesen (Abbildung 5-18).

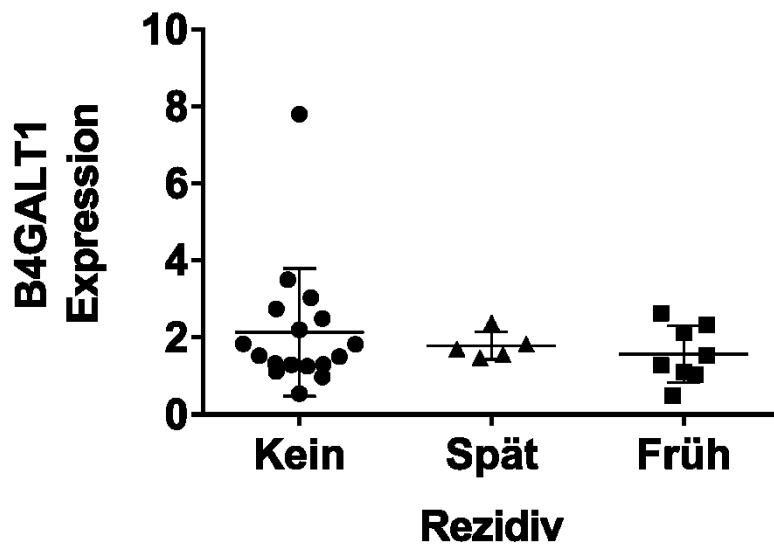


**Abbildung 5-17 RNA Expression von B4GALT1 in Monozyten.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,2659$ ).

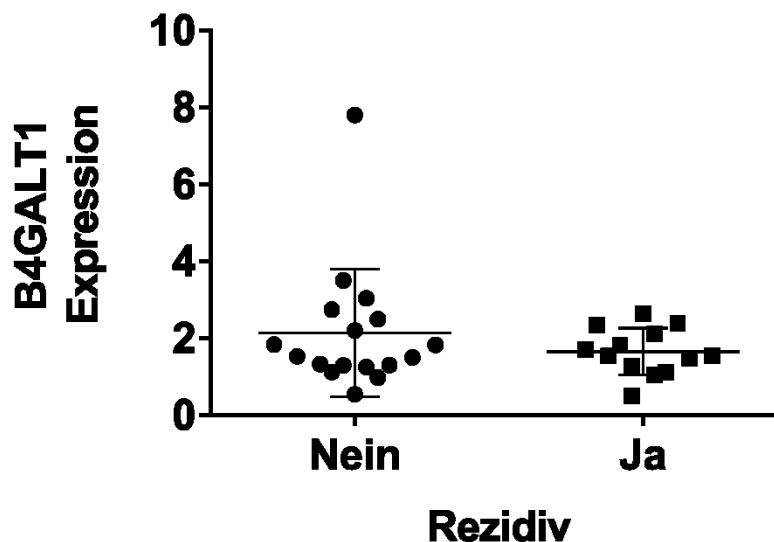


**Abbildung 5-18 RNA Expression von B4GALT1 in Monozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,2505$ ).

Die qPCR wurde auch an einer Probe unsortierter Zellen durchgeführt. In dieser Probe befanden sich alle mononukleären Zellen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abbildung 5-19), auch nicht bei der gemeinsamen Auswertung der Rezidivgruppen (Abbildung 5-20).



**Abbildung 5-19 RNA Expression von B4GALT1 in der unsortierten Zellpopulation.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,5987$ ).



**Abbildung 5-20 RNA Expression von B4GALT1 in der unsortierten Zellpopulation mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die mittels qPCR bestimmte

Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,6501$ ).

### **5.3.2 IL10**

Für IL10 konnten bereits mannigfaltige Rollen im Zusammenhang mit Tumorkontrolle nachgewiesen werden, sowohl Tumorwachstum fördernde, als auch hemmende<sup>99</sup>.

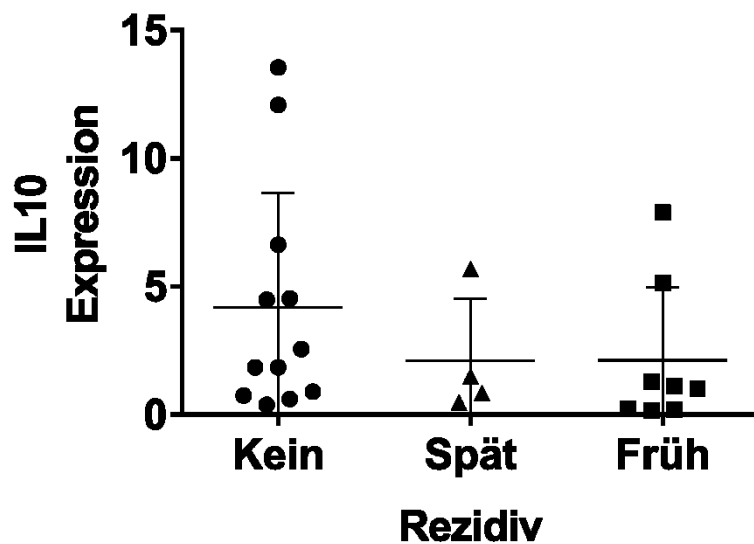
Die qPCR wurde durchgeführt, um das Expressionsniveau von IL10 in den Monozyten und T-Lymphozyten der Patientenproben auf dem Nukleinsäure Level nachzuweisen. Zur Bestimmung der Standardkurve wurde hier cDNA von Leukozyten, die aus einer von mir selbst gewonnenen Blutprobe extrahiert wurde, genutzt. Die cDNA wurde ebenfalls in den oben genannten Verdünnungsstufen eingesetzt. Die Annealing-Temperatur war hier bereits bekannt, weshalb keine weitere Gradienten-PCR durchgeführt wurde.

Auch für IL10 wurde das Expressionsniveau für Monozyten und T-Lymphozyten getrennt bestimmt und der Vergleich zwischen den Patientengruppen angestellt.

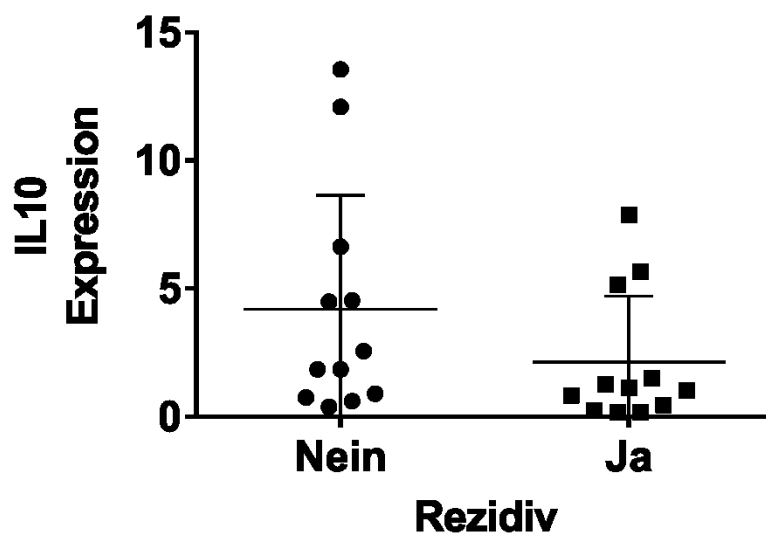
Die Auswertung wurde ebenfalls analog zu den oben beschriebenen Parametern vorgenommen. Zwischen den drei Gruppen Kein, Früh- und Spätrezidiv konnte sowohl in der Population der Monozyten, als auch der T-Lymphozyten kein signifikanter Unterschied der IL10-Expression festgestellt werden. Auch bei gemeinsamer Auswertung der beiden Rezidivgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 5-21 bis 5-24).

---

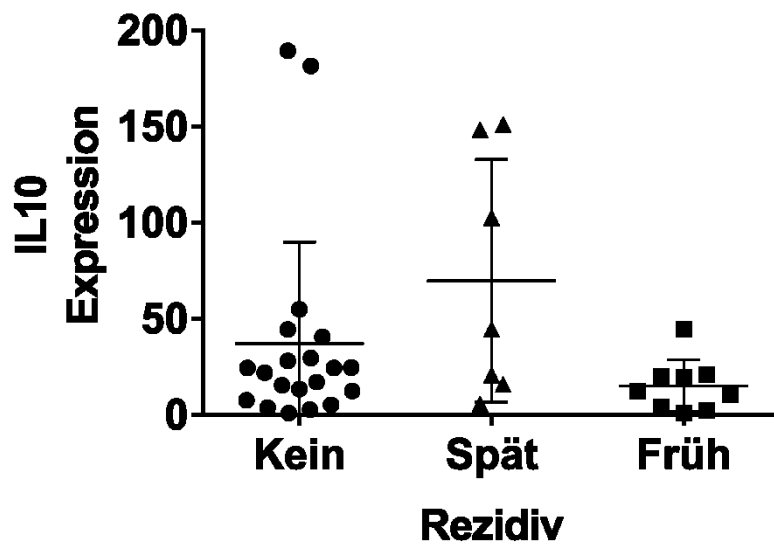
<sup>99</sup> Candido und Hagemann 2013



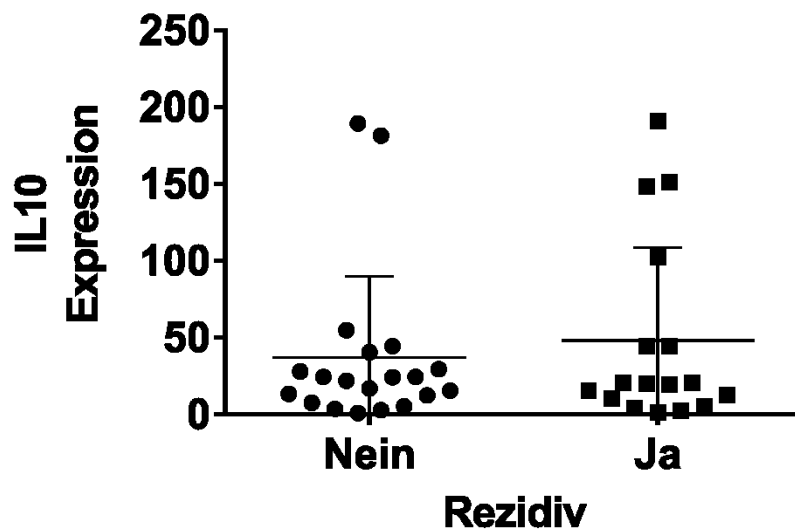
**Abbildung 5-21 RNA Expression von IL10 in T-Lymphozyten.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,3606$ ).



**Abbildung 5-22 RNA Expression von IL10 in T-Lymphozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,1782$ ).



**Abbildung 5-23 RNA Expression von IL10 in Monozyten.** Die Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (einseitiger ANOVA-Test,  $p=0,2659$ ).



**Abbildung 5-24 RNA Expression von IL10 in Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen.** Die mittels qPCR bestimmte Expression unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-Test,  $p=0,9880$ ).

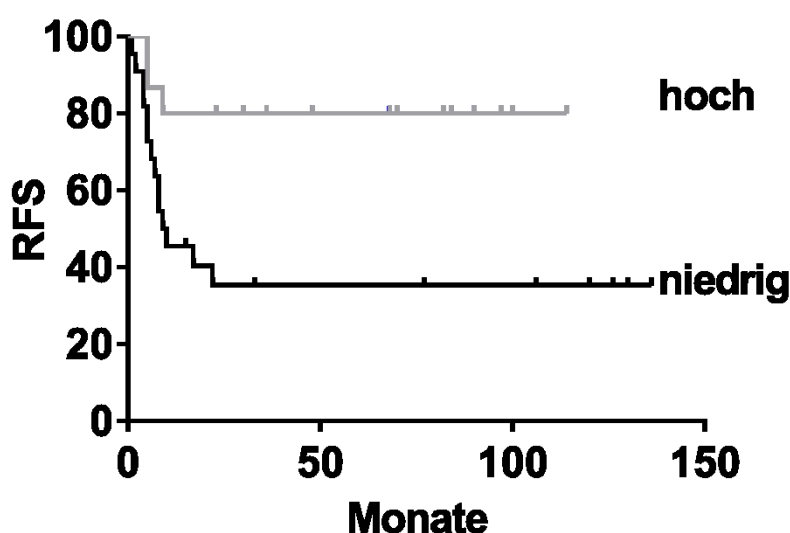


## 5.4 Kaplan-Meier Analyse

Wir konnten zeigen, dass diejenigen Patienten, die eine hohe B4GALT1 Expression auf T-Lymphozyten haben, seltener ein Rezidiv der Hodentumorerkrankung erleiden. Um darauf aufbauend B4GALT1 als möglichen prognostischen Marker zu evaluieren, wurde eine Kaplan-Meier Analyse der Daten mit log-rank Test durchgeführt. Dazu wurde das Patientenkollektiv anhand des Mittelwertes der B4GALT1-Expression in zwei Gruppen unterteilt. Die mittlere Expression betrug 2,57. Diejenigen mit einem niedrigeren bzw. einem höheren Wert wurden jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst.

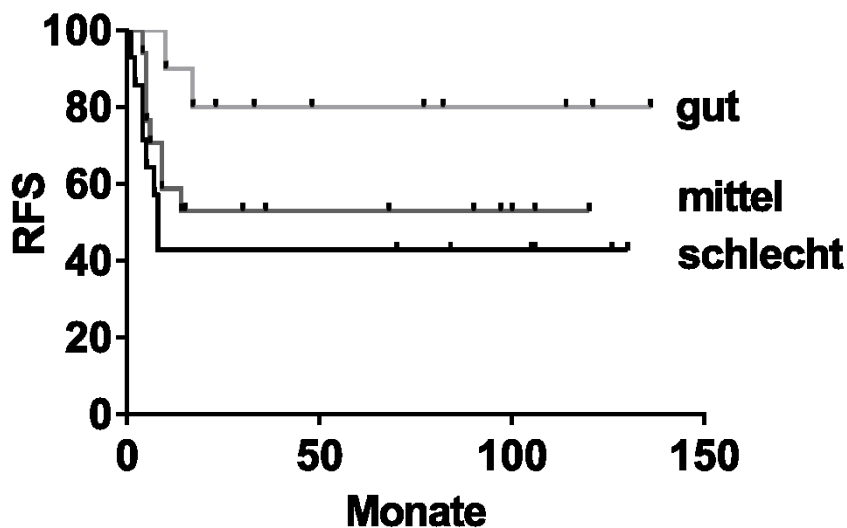
Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer hohen B4GALT1 Expression ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben hatten ( $p=0,0111$ , Abbildung 5-25).

Weiterhin wurden die Patienten auch anhand ihres IPF-Scores gruppiert und einer Kaplan-Meier Analyse mit log-rank Test zugeführt (Abbildung 5-26). Es wurde zwischen drei Gruppen mit guter, mittlerer und schlechter Prognose unterschieden. In der guten Prognosegruppe wurden die Patienten mit minus einem und null Punkten, in der mittleren mit einem Punkt und in der schlechten Prognosegruppe diejenigen mit zwei und drei Punkten geführt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des RFS festgestellt werden.



**Abbildung 5-25 Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patienten mit hoher und niedriger B4GALT1-Expression.** Hohe Expression wurde definiert als Expression, die höher als der Mittelwert lag; Niedrige Expression dementsprechend niedriger als der

Mittelwert. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen erwies sich als signifikant ( $p=0,0111$ ).



**Abbildung 5-26 Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patienten mit niedrigem und hohem internationalen Prognosescore (IPF).** Die Analyse des internationalen Prognosescores für unsere Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben zwischen denjenigen Patienten mit guter (null Punkte), denen mit mittlerer (ein Punkt) und denen mit schlechter Prognose (zwei und drei Punkte).

## 5.5 Cox-Regressionsanalyse

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen B4GALT1-Expression auf T-Lymphozyten ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben haben. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und einen Einfluss anderer Variablen auszuschließen, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Parameter Anzahl der Hochdosisschemotherapie (HDCT)-Zyklen und IPF- Score als mögliche Einflussgrößen untersucht. Das Hazard Ratio für die B4GALT1 Expression auf T-Lymphozyten betrug in der univariaten Analyse 0,62 (95%-Konfidenzintervall 0,42-0,91;  $p$ -Wert=0,02). Auch in der multivariaten Analyse zeigte sich die B4GALT1-Expression auf T-Lymphozyten als unabhängige Einflussgröße auf die Überlebenswahrscheinlichkeit mit einem Hazard Ratio von 0,66 (95% Konfidenzintervall 0,45-0,97;  $p$ -Wert=0,03).

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von B4GALT1 in T-Lymphozyten, die aus dem peripheren Blut von Hodentumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien vor der Durchführung einer Hochdosismotherapie mit autologer Stammzelltransplantation gewonnen wurden, höher ist in den Zellen derer, die kein Rezidiv der Erkrankung erlitten haben. Außerdem wurde nachgewiesen, dass diejenigen Patienten mit einer hohen B4GALT1-Expression in den peripheren T-Lymphozyten ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben hatten. Der Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bestätigte sich auch in der Cox-Regressionsanalyse und zeigte sich unabhängig von der Anzahl der Hochdosismotherapien und dem IPF-Score.

Der Unterschied in der B4GALT1 Expression ließ sich nur auf den T-Lymphozyten nachweisen, nicht jedoch in der unsortierten Gesamtpopulation der mononukleären Zellen. Dies zeigt, dass es für die Bestimmung von prognostischen Markern relevant sein kann eine bestimmte Zellpopulation gezielt separat zu untersuchen, um somit Unterschiede, die sich nur auf einer Population finden, nachweisen zu können.

Im Vergleich zu dem etablierten IPF-Score wurde der Krankheitsverlauf der Patienten durch die Höhe der B4GALT1-Expression in peripheren T-Zellen besser geschätzt. Einschränkend muss hier gesagt werden, dass der IPF-Score für die Gruppe der Patienten, die sich im ersten Rezidiv befinden entwickelt und evaluiert wurde. Die hier untersuchte Kohorte war diesbezüglich heterogen. Drei Patienten wurden primär hochdosistherapiert, andere befanden sich auch im zweiten Rezidiv. Für die Anwendung auf diese Gruppe ist das Punktesystem demnach nicht evaluiert. Bislang existiert allerdings keine Alternative. Aus diesem Grund könnte B4GALT1 in Zukunft als neuer prognostischer Marker für Hodentumorpatienten in fortgeschrittenen Stadien dienen. Des Weiteren könnte eine Evaluation für den Einsatz als prädiktiver Marker bei Patienten mit Erstdiagnose eines testikulären Keimzelltumors in weiteren Studien erfolgen. Diese Ergebnisse legen außerdem nahe, dass immunobiologische Effekte auch in Keimzelltumoren des Hodens einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorkontrolle haben könnten.

Voran gegangene Studien über B4GALT1 beleuchteten unter anderem dessen Rolle in der T-Zellproliferation. Insbesondere die Proliferation der CD4-positiven T-Zellen ist von der Interaktion mit dendritischen Zellen abhängig. In dieser Interaktion scheint B4GALT1 eine wichtige Rolle zu spielen<sup>100</sup>.

In der Entwicklung des multiplen Myeloms ausgehend von der benignen monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) tritt im Verlauf der Erkrankung eine Abweichung der IgG-Glykosylierung auf<sup>101,102</sup>. Dabei konnten Mittermayr et al. zeigen, dass die mRNA Expression von B4GALT1 signifikant reduziert war in malignen Zellen im Vergleich zu Plasmazellen von Patienten mit MGUS und gesunden Kontrollen<sup>103</sup>. Außerdem war die veränderte Glykosylierung assoziiert mit einer Reduzierung der pro-inflammatorischen Zytokine. Die Autoren postulieren, dass die malignen Zellen so besser der Kontrolle durch Immunzellen entgehen können<sup>104</sup>. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von IL10 bestimmt. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht eindeutig gefunden werden. In der Arbeit von Mittermayr et al. waren die Interferon  $\gamma$ - Spiegel bei den Patienten mit malignen Stadien reduziert. Eine Untersuchung der B4GALT1 Expression in den Plasmazellen unserer Patienten, sowie die Bestimmung der Interferon  $\gamma$ -Spiegel, könnten diesbezüglich weitere interessante Untersuchungen sein.

Auch konnte für das Colonkarzinom gezeigt werden, dass eine Methylierung des B4GALT1-Promotors zu einer verringerten Expression führte. Diese wiederum war mit invasiver wachsenden Tumoren vergesellschaftet<sup>105</sup>. Dies wirft die Frage auf, ob auch in dem hier beschriebenen Fall der testikulären Keimzelltumore epigenetische Veränderungen, im Sinne einer Promotormethylierung, für die Expressionsunterschiede verantwortlich sind.

Wie bereits herausgefunden wurde hat in Hodentumoren der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (englisch: epidermal growthfactor receptor, EGFR) einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von invasiven Karzinomen

---

<sup>100</sup> Cheng et al. 2010

<sup>101</sup> Moehler et al. 2013

<sup>102</sup> Mittermayr et al. 2017

<sup>103</sup> Mittermayr et al. 2017

<sup>104</sup> Mittermayr et al. 2017

<sup>105</sup> Poeta et al. 2012

aus nicht malignen Vorläuferläsionen<sup>106</sup>. Leider war es nicht möglich an der hier vorliegenden Patientenkohorte einen EGFR-Nachweis im primären Tumormaterial durchzuführen, da uns dieses in der überwiegenden Zahl der Fälle nicht vorlag. Für das hepatozelluläre Karzinom wiesen Tang et al. nach, dass B4GALT1 direkt mit EGFR interagiert und so den EGFR-Signalweg inhibiert<sup>107,108</sup>. Inwiefern dieser Zusammenhang ebenfalls zwischen der Expression von B4GALT1 in T-Zellen und EGFR im Tumorgewebe von testikulären Keimzelltumoren besteht, könnte ein interessanter Gegenstand zukünftiger Studien sein. Eventuell könnten T-Zellen mit B4GALT1 auf ihrer Oberfläche in das Tumorgewebe einwandern und dort durch Interaktion mit dem EGFR auf der Oberfläche der Tumorzellen zu einer EGFR-Inaktivierung durch verringerte Bindung des Liganden EGF führen. Dies würde dann eine Apoptose der Tumorzellen einleiten und erklären, inwiefern B4GALT1 auf T-Zellen mit einer besseren Tumorkontrolle assoziiert ist.

Darüber hinaus gibt es aufbauend auf den hier vorliegenden Ergebnissen viele weitere Fragen, die in folgenden Untersuchungen adressiert werden könnten. Beispielsweise existieren diverse weitere Oberflächenmoleküle, die in Zell-Zell-Interaktionen zwischen Immunsystem und Tumorzellen eine Rolle spielen, die bis dato noch nicht auf ihren Einfluss auf die Tumorkontrolle in testikulären Keimzelltumoren hin analysiert wurden. Auch andere Zytokine als Vermittler und Steuerungssignale der Immunzellen könnten Einfluss auf die Tumorkontrolle ausüben. Sicher wären als nächste Schritte für die weitere Evaluation von B4GALT1 als prognostischen Marker die Validierung der Ergebnisse an einem weiteren Probensatz, sowie daran anschließend die Umsetzung in eine prospektive, multizentrische Studie nötig, um den betroffenen Patienten in Zukunft noch besser auf sie zugeschnittene Therapieschemata anbieten zu können. Die routinemäßige Bestimmung von B4GALT1 in peripheren T-Lymphozyten stellt technisch keinen großen Aufwand dar. Die Messung könnte mithilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers in einem Durchflusszytometer erfolgen. Darüber hinaus wäre, insofern sich die Ergebnisse bestätigen lassen sollten, auch eine adjuvante, T-zellstimulierende

---

<sup>106</sup> Miyai et al. 2010

<sup>107</sup> Tang et al. 2013

<sup>108</sup> Michailidi et al. 2014

Therapie als neue Option zur Behandlung derjenigen Patienten mit niedriger B4GALT1-Expression in Betracht zu ziehen.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Alevizos, Leonidas; Gomatos, Ilias P.; Smparounis, Spyridon; Konstadoulakis, Manousos M.; Zografos, Georgios (2012): Review of the molecular profile and modern prognostic markers for gastric lymphoma: how do they affect clinical practice? In: *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie* 55 (2), S. 117–124. DOI: 10.1503/cjs.002310.
- 2 Arbones, Maria L.; Ord, David C.; Ley, Klaus; Ratech, Howard; Maynard-Curry, Catherine; Otten, Gib et al. (1994): Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. In: *Immunity* 1 (4), S. 247–260. DOI: 10.1016/1074-7613(94)90076-0.
- 3 Austrup, F.; Vestweber, D.; Borges, E.; Löhning, M.; Bräuer, R.; Herz, U. et al. (1997): P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. In: *Nature* 385 (6611), S. 81–83. DOI: 10.1038/385081a0.
- 4 Bachelder, Robin E.; Wendt, Melissa A.; Mercurio, Arthur M. (2002): Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. In: *Cancer Res* 62 (24), S. 7203–7206.
- 5 Baldwin, R. W. (1966): Tumour-specific immunity against spontaneous rat tumours. In: *Int. J. Cancer* 1 (3), S. 257–264. DOI: 10.1002/ijc.2910010305.
- 6 Balkwill, Fran (2004a): Cancer and the chemokine network. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (7), S. 540–550. DOI: 10.1038/nrc1388.
- 7 Balkwill, Fran (2004b): The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. In: *Chemokines in Neoplastic Progression* 14 (3), S. 171–179. DOI: 10.1016/j.semcancer.2003.10.003.
- 8 Bartolome, Ruben A.; Galvez, Beatriz G.; Longo, Natividad; Baleux, Francoise; Van Muijen, Goos N P; Sanchez-Mateos, Paloma et al. (2004): Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. In: *Cancer Res* 64 (7), S. 2534–2543.

- 9 Bergom, Carmen; Gao, Cunji; Newman, Peter J. (2005): Mechanisms of PECAM-1-mediated cytoprotection and implications for cancer cell survival. In: *Leukemia & lymphoma* 46 (10), S. 1409–1421. DOI: 10.1080/10428190500126091.
- 10 Brown, Michael; Wittwer, Carl (2000): Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. In: *Clinical Chemistry* 46 (8), S. 1221–1229.
- 11 Burchert, A.; Saussele, S.; Eigendorff, E.; Muller, M. C.; Sohlbach, K.; Inselmann, S. et al. (2015): Interferon alpha 2 (IFN) maintenance therapy may enable high rates of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia (CML). In: *Leukemia*. DOI: 10.1038/leu.2015.45.
- 12 Burchert, Andreas; Müller, Martin C.; Kostrewa, Philippe; Erben, Philipp; Bostel, Tilman; Liebler, Simone et al. (2010): Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (8), S. 1429–1435. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.5075.
- 13 Candido, Juliana; Hagemann, Thorsten (2013): Cancer-related inflammation. In: *Journal of clinical immunology* 33 Suppl 1, S. S79-84. DOI: 10.1007/s10875-012-9847-0.
- 14 Charpin, C.; Devictor, B.; Bergeret, D.; Andrac, L.; Boulat, J.; Horschowski, N. et al. (1995): CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors. In: *Am J Clin Pathol* 103 (4), S. 443–448.
- 15 Charpin, C.; Garcia, S.; Bouvier, C.; Martini, F.; Andrac, L.; Bonnier, P. et al. (1997): CD31/PECAM automated and quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas: correlation with patient follow-up. In: *Am J Clin Pathol* 107 (5), S. 534–541.
- 16 Chen, Yangchao; Stamatoyannopoulos, George; Song, Chao-Zhong (2003): Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. In: *Cancer Res* 63 (16), S. 4801–4804.



- 17 Cheng, Xiang; Wang, Xiaoying; Han, Yu; Wu, Yuanyuan (2010): The expression and function of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-I in dendritic cells. In: *Cellular immunology* 266 (1), S. 32–39. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.08.008.
- 18 Dalgaard, Marlene D.; Weinhold, Nils; Edsgård, Daniel; Silver, Jeremy D.; Pers, Tune H.; Nielsen, John E. et al. (2012): A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. In: *Journal of medical genetics* 49 (1), S. 58–65. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100174.
- 19 Fuchs, Bernhard: [Durchflusszytometrie]. Online verfügbar unter <https://www.mpi-bremen.de/Durchflusszytometrie.html>, zuletzt geprüft am 13.06.2017.
- 20 Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S. et al. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. In: *Blood* 54 (3), S. 713–733.
- 21 Gao, Cunji; Sun, Weiyong; Christofidou-Solomidou, Melpo; Sawada, Motoshi; Newman, Debra K.; Bergom, Carmen et al. (2003): PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. In: *Blood* 102 (1), S. 169–179. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0003.
- 22 GE Healthcare Bio-Sciences AB (Hg.) (2014): Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications. Uppsala, Schweden. Online verfügbar unter [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1353593752833/litdoc18115269\\_20161015161132.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1353593752833/litdoc18115269_20161015161132.pdf), zuletzt geprüft am 15.06.2017.
- 23 Hall, Julie M.; Korach, Kenneth S. (2003): Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 17 (5), S. 792–803. DOI: 10.1210/me.2002-0438.
- 24 Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- 25 Hanna, Nasser H.; Einhorn, Lawrence H. (2014): Testicular cancer--discoveries and updates. In: *The New England journal of medicine* 371 (21), S. 2005–2016. DOI: 10.1056/NEJMra1407550.
- 26 Hartmann, Jörg; Lorch, Anja (2011): Solide Tumoren bei jungen Patienten. In: *Onkologie* (34), S. 12–16. DOI: 10.1159/000329908.
- 27 Helbig, Gregory; Christopherson, Kent W.; Bhat-Nakshatri, Poornima; Kumar, Suresh; Kishimoto, Hiromitsu; Miller, Kathy D. et al. (2003): NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (24), S. 21631–21638. DOI: 10.1074/jbc.M300609200.
- 28 Hemminki, K.; Li, X. (2004): Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. In: *British journal of cancer* 90 (9), S. 1765–1770. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601714.
- 29 Hirsch, Michelle S. (2014): Anatomy and pathology of testicular tumors. In: *UptoDate*, zuletzt geprüft am 24.03.2015.
- 30 Jackson, D. E.; Gully, L. M.; Henshall, T. L.; Mardell, C. E.; Macardle, P. J. (2000): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is associated with a naive B-cell phenotype in human tonsils. In: *Tissue Antigens* 56 (2), S. 105–116.
- 31 Jin, Hui; Aiyer, Aparna; Su, Jingmei; Borgstrom, Per; Stupack, Dwayne; Friedlander, Martin; Varner, Judy (2006): A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. In: *J Clin Invest* 116 (3), S. 652–662. DOI: 10.1172/JCI24751.
- 32 Johnson, F. M.; Shur, B. D. (1999): The level of cell surface beta1,4-galactosyltransferase I influences the invasive potential of murine melanoma cells. In: *J Cell Sci* 112 (Pt 16), S. 2785–2795.
- 33 Kamta, Jeff; Chaar, Maher; Ande, Anusha; Altomare, Deborah A.; Ait-Oudhia, Sihem (2017): Advancing Cancer Therapy with Present and Emerging Immuno-Oncology Approaches. In: *Frontiers in oncology* 7, S. 64. DOI: 10.3389/fonc.2017.00064.

- 34 Kanehisa Laboratories (Hg.): KEGG pathway. Online verfügbar unter [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?pathway+hsa04670](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04670), zuletzt geprüft am 15.06.2017.
- 35 Kaplan, Rosandra N.; Riba, Rebecca D.; Zacharoulis, Stergios; Bramley, Anna H.; Vincent, Loïc; Costa, Carla et al. (2005): VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. In: *Nature* 438 (7069), S. 820–827. DOI: 10.1038/nature04186.
- 36 Kim, Unkyu; Siegel, Rachael; Ren, Xiaodi; Gunther, Cary S.; Gaasterland, Terry; Roeder, Robert G. (2003): Identification of transcription coactivator OCA-B-dependent genes involved in antigen-dependent B cell differentiation by cDNA array analyses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15), S. 8868–8873. DOI: 10.1073/pnas.1033108100.
- 37 Koeffler, H. P.; Billing, R.; Lusi, A. J.; Sparkes, R.; Golde, D. W. (1980): An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). In: *Blood* 56 (2), S. 265–273.
- 38 Lech-Maranda, Ewa; Baseggio, Lucile; Bienvenu, Jacques; Charlot, Carole; Berger, Françoise; Rigal, Dominique et al. (2004): Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. In: *Blood* 103 (9), S. 3529–3534. DOI: 10.1182/blood-2003-06-1850.
- 39 Lech-Maranda, Ewa; Bienvenu, Jacques; Michallet, Anne-Sophie; Houot, Roch; Robak, Tadeusz; Coiffier, Bertrand; Salles, Gilles (2006): Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. In: *Eur Cytokine Netw* 17 (1), S. 60–66.
- 40 Lee, Chung-Gi; Das, Bikul; Lin, Tara L.; Grimes, Chelsea; Zhang, Xin; Lavezzi, Tracey et al. (2012): A rare fraction of drug-resistant follicular lymphoma cancer stem cells interacts with follicular dendritic cells to maintain tumorigenic potential. In: *Br J Haematol* 158 (1), S. 79–90. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09123.x.
- 41 Lee, Mike; Kiefel, Helena; LaJevic, Melissa D.; Macauley, Matthew S.; Kawashima, Hiroto; O'Hara, Edward et al. (2014): Transcriptional programs of lymphoid tissue capillary and high endothelium reveal control mechanisms for

lymphocyte homing. In: *Nature immunology* 15 (10), S. 982–995. DOI: 10.1038/ni.2983.

42 Li, Ying; Gao, Ping; Yang, Junlan; Yu, Haiming; Zhu, Yanyun; Si, Wen (2014): Relationship between IL-10 expression and prognosis in patients with primary breast cancer. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (11), S. 11533–11540. DOI: 10.1007/s13277-014-2249-6.

43 Lorch, Anja; Beyer, Jörg; Bascoul-Molleivi, Caroline; Kramar, Andrew; Einhorn, Lawrence H.; Necchi, Andrea et al. (2010): Prognostic factors in patients with metastatic germ cell tumors who experienced treatment failure with cisplatin-based first-line chemotherapy. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (33), S. 4906–4911. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.8128.

44 Lorch, Anja; Kleinhans, Antje; Kramar, Andrew; Kollmannsberger, Christian K.; Hartmann, Jörg T.; Bokemeyer, Carsten et al. (2012): Sequential versus single high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors: long-term results of a prospective randomized trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (8), S. 800–805. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.6391.

45 Lorch, Anja; Kollmannsberger, Christian; Hartmann, Joerg Thomas; Metzner, Bernd; Schmidt-Wolf, Ingo G H; Berdel, Wolfgang E. et al. (2007): Single versus sequential high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors: a prospective randomized multicenter trial of the German Testicular Cancer Study Group. In: *J Clin Oncol* 25 (19), S. 2778–2784. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.2148.

46 Lu, Charles; Soria, Jean-Charles; Tang, Ximing; Xu, Xiao-Chun; Wang, Luo; Mao, Li et al. (2004): Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. In: *J Clin Oncol* 22 (22), S. 4575–4583. DOI: 10.1200/JCO.2004.01.091.

47 Lu, Yan; Wang, Liang; Liu, Pengyuan; Yang, Ping; You, Ming; Cho, William C. S. (2012): Gene-Expression Signature Predicts Postoperative

Recurrence in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer Patients. In: *PLoS ONE* 7 (1), S. e30880. DOI: 10.1371/journal.pone.0030880.

48 Mantovani, Alberto; Allavena, Paola; Sica, Antonio; Balkwill, Frances (2008): Cancer-related inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 436–444. DOI: 10.1038/nature07205.

49 Michailidi, Christina; Soudry, Ethan; Brait, Mariana; Maldonado, Leonel; Jaffe, Andrew; Ili-Gangas, Carmen et al. (2014): Genome-wide and gene-specific epigenomic platforms for hepatocellular carcinoma biomarker development trials. In: *Gastroenterology research and practice* 2014, S. 597164. DOI: 10.1155/2014/597164.

50 Mittermayr, Stefan; Lê, Giao N.; Clarke, Colin; Millán Martín, Silvia; Larkin, Anne-Marie; O'Gorman, Peter; Bones, Jonathan (2017): Polyclonal Immunoglobulin G N-Glycosylation in the Pathogenesis of Plasma Cell Disorders. In: *Journal of proteome research* 16 (2), S. 748–762. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00768.

51 Miyai, Kosuke; Yamamoto, Sohei; Asano, Tomohiko; Tamai, Seiichi; Matsubara, Osamu; Tsuda, Hitoshi (2010): Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in adult testicular germ cell tumors: potential role in tumor progression. In: *Cancer science* 101 (9), S. 1970–1976. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01638.x.

52 Moehler, Thomas M.; Seckinger, Anja; Hose, Dirk; Andrulis, Mindaugas; Moreaux, Jérôme; Hielscher, Thomas et al. (2013): The glycome of normal and malignant plasma cells. In: *PLoS ONE* 8 (12), S. e83719. DOI: 10.1371/journal.pone.0083719.

53 Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E. et al. (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. In: *Nature* 410 (6824), S. 50–56. DOI: 10.1038/35065016.

54 Munoz, Nilda M.; Leff, Alan R. (2006): Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. In: *Nature protocols* 1 (6), S. 2613–2620. DOI: 10.1038/nprot.2006.340.

- 55 National Center for Biotechnology Information; U.S. National Library of Medicine (Hg.) (2017): B4GALT1, zuletzt aktualisiert am 06.06.2017, zuletzt geprüft am 15.06.2017.
- 56 Ogden, C. A.; Pound, J. D.; Batth, B. K.; Owens, S.; Johannessen, I.; Wood, K.; Gregory, C. D. (2005): Enhanced Apoptotic Cell Clearance Capacity and B Cell Survival Factor Production by IL-10-Activated Macrophages: Implications for Burkitt's Lymphoma. In: *The Journal of Immunology* 174 (5), S. 3015–3023. DOI: 10.4049/jimmunol.174.5.3015.
- 57 Papayannopoulou, T.; Craddock, C.; Nakamoto, B.; Priestley, G. V.; Wolf, N. S. (1995): The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (21), S. 9647–9651.
- 58 Papayannopoulou, T.; Priestley, G. V.; Nakamoto, B.; Zafiropoulos, V.; Scott, L. M. (2001): Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. In: *Blood* 98 (8), S. 2403–2411.
- 59 Perez, Edith A.; Thompson, E. Aubrey; Ballman, Karla V.; Anderson, S. Keith; Asmann, Yan W.; Kalari, Krishna R. et al. (2015): Genomic Analysis Reveals That Immune Function Genes Are Strongly Linked to Clinical Outcome in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Trastuzumab Trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.6298.
- 60 Pettersson, Andreas; Richiardi, Lorenzo; Nordenskjöld, Agneta; Kaijser, Magnus; Akre, Olof (2007): Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. In: *The New England journal of medicine* 356 (18), S. 1835–1841. DOI: 10.1056/NEJMoa067588.
- 61 Poeta, Maria Luana; Massi, Emanuela; Parrella, Paola; Pellegrini, Pasquale; Robertis, Mariangela de; Copetti, Massimiliano et al. (2012): Aberrant promoter methylation of beta-1,4 galactosyltransferase 1 as potential cancer-specific biomarker of colorectal tumors. In: *Genes, chromosomes & cancer* 51 (12), S. 1133–1143. DOI: 10.1002/gcc.21998.

- 62     Preiß, Joachim; Honecker, Friedemann; Claßen, Johannes; Dornoff, Wolfgang (Hg.) (2017): Solide Tumoren - Geschlechtsorgane und Brust - Keimzelltumoren. Klassifikation. Online verfügbar unter [http://www.onkologie2017.de/solidetumoren/geschlecht/keimzell\\_klassifikation.htm](http://www.onkologie2017.de/solidetumoren/geschlecht/keimzell_klassifikation.htm), zuletzt aktualisiert am 25.04.2017, zuletzt geprüft am 13.06.2017.
- 63     Preiß, Joachim; Honecker, Friedemann; Claßen, Johannes; Dornoff, Wolfgang (Hg.) (2016): Solide Tumoren - Geschlechtsorgane und Brust - Keimzelltumoren. Therapie & Nachsorge. Online verfügbar unter [http://www.onkologie2016.de/solidetumoren/geschlecht/keimzell\\_therapie.htm](http://www.onkologie2016.de/solidetumoren/geschlecht/keimzell_therapie.htm), zuletzt aktualisiert am 21.06.2016, zuletzt geprüft am 22.06.2016.
- 64     Russo, R. N.; Shaper, N. L.; Shaper, J. H. (1990): Bovine beta 1----4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains. In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II membrane-bound glycoproteins. In: *J Biol Chem* 265 (6), S. 3324–3331.
- 65     Scala, Stefania; Giuliano, Paola; Ascierto, Paolo A.; Ierano, Caterina; Franco, Renato; Napolitano, Maria et al. (2006): Human melanoma metastases express functional CXCR4. In: *Clin Cancer Res* 12 (8), S. 2427–2433. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1940.
- 66     Schioppa, Tiziana; Uranchimeg, Badarch; Saccani, Alessandra; Biswas, Subhra K.; Doni, Andrea; Rapisarda, Annamaria et al. (2003): Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (9), S. 1391–1402. DOI: 10.1084/jem.20030267.
- 67     Siegel, Rebecca; Ward, Elizabeth; Brawley, Otis; Jemal, Ahmedin (2011): Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 61 (4), S. 212–236. DOI: 10.3322/caac.20121.
- 68     Staller, Peter; Sulitkova, Jitka; Lisztwan, Joanna; Moch, Holger; Oakeley, Edward J.; Krek, Wilhelm (2003): Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. In: *Nature* 425 (6955), S. 307–311. DOI: 10.1038/nature01874.

- 69 Steele, Graeme S.; Richie, Jerome P.; Oh, William K.; Michaelson, M. Dror (2015): Clinical manifestations, diagnosis, and staging of testicular germ cell tumors. In: *UpToDate*, zuletzt geprüft am 21.04.2015.
- 70 Tang, Wenqing; Weng, Shuqiang; Zhang, Si; Wu, Weibing; Dong, Ling; Shen, Xizhong et al. (2013): Direct interaction between surface  $\beta 1,4$ -galactosyltransferase 1 and epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibits EGFR activation in hepatocellular carcinoma. In: *Biochemical and biophysical research communications* 434 (3), S. 449–454. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.094.
- 71 van der Velden, V. H. J.; Hochhaus, A.; Cazzaniga, G.; Szczepanski, T.; Gabert, J.; van Dongen, J. J. M. (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. In: *Leukemia* 17 (6), S. 1013–1034. DOI: 10.1038/sj.leu.2402922.
- 72 Wai Wong, Chee; Dye, Danielle E.; Coombe, Deirdre R. (2012): The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. In: *International journal of cell biology* 2012, S. 340296. DOI: 10.1155/2012/340296.
- 73 Wang, C.; Curtis, J. E.; Minden, M. D.; McCulloch, E. A. (1989): Expression of a retinoic acid receptor gene in myeloid leukemia cells. In: *Leukemia* 3 (4), S. 264–269.
- 74 Watt, S. M.; Williamson, J.; Geneviev, H.; Fawcett, J.; Simmons, D. L.; Hatzfeld, A. et al. (1993): The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. In: *Blood* 82 (9), S. 2649–2663.



## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4-1 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque® .....	20
Abbildung 4-2 Seitwärts- gegen Vorwärtsstreulichtdarstellung .....	23
Abbildung 4-3 CD3 gegen CD14-Darstellung .....	23
Abbildung 4-4 Prinzip Durchflusszytometrie und FACS® .....	25
Abbildung 4-5 Prinzip der quantitativen PCR .....	28
Abbildung 5-1 Anteil der T-Lymphozyten an allen lebenden Zellen für die drei Gruppen Kein-, Spät- und Frührezidiv .....	36
Abbildung 5-2 Anteil der Monozyten an allen lebenden Zellen für die drei Gruppen Kein-, Spät- und Frührezidiv .....	37
Abbildung 5-3 Höhe der PECAM-1-Expression auf T-Lymphozyten .....	38
Abbildung 5-4 Höhe der PECAM-1-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	38
Abbildung 5-5 Höhe der PECAM-1-Expression auf Monozyten .....	39
Abbildung 5-6 Höhe der PECAM-1-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	39
Abbildung 5-7 Höhe der VLA-4-Expression auf T-Lymphozyten .....	40
Abbildung 5-8 Höhe der VLA-4-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	41
Abbildung 5-9 Höhe der VLA-4-Expression auf Monozyten .....	41
Abbildung 5-10 Höhe der VLA-4-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	42
Abbildung 5-11 Höhe der CXCR4-Expression auf T-Lymphozyten .....	43
Abbildung 5-12 Höhe der CXCR4-Expression auf T-Lymphozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	43
Abbildung 5-13 Höhe der CXCR4-Expression auf Monozyten .....	44
Abbildung 5-14 Höhe der CXCR4-Expression auf Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	44
Abbildung 5-15 RNA-Expression von B4GALT1 in T-Lymphozyten .....	46
Abbildung 5-16 RNA Expression von B4GALT1 in T-Lymphozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen .....	46
Abbildung 5-17 RNA Expression von B4GALT1 in Monozyten .....	47

Abbildung 5-18 RNA Expression von B4GALT1 in Monozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. ....	47
Abbildung 5-19 RNA Expression von B4GALT1 in der unsortierten Zellpopulation.....	48
Abbildung 5-20 RNA Expression von B4GALT1 in der unsortierten Zellpopulation mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. ....	48
Abbildung 5-21 RNA Expression von IL10 in T-Lymphozyten. ....	50
Abbildung 5-22 RNA Expression von IL10 in T-Lymphozyten mit gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. ....	50
Abbildung 5-23 RNA Expression von IL10 in Monozyten. ....	51
Abbildung 5-24 RNA Expression von IL10 in Monozyten bei gemeinsamer Auswertung der Rezidivgruppen. ....	51
Abbildung 5-25 Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patienten mit hoher und niedriger B4GALT1-Expression.....	52
Abbildung 5-26 Kaplan-Meier Überlebenskurve für Patienten mit niedrigem und hohem internationalen Prognosescore (IPF). ....	53

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Stadieneinteilung der testikulären Keimzelltumore nach der AJCC-Klassifikation. ....	6
Tabelle 3-2 Stadienabhängige adjuvante Therapie des Seminoms. ....	7
Tabelle 3-3 Stadienabhängige adjuvante Therapie des Nicht-Seminoms.....	8
Tabelle 3-4 Parameter des IPF-Scores. ....	9
Tabelle 3-5 Zuordnung der Risikogruppen anhand der Punktesumme und zugehörige 3-Jahresüberlebensraten. ....	9
Tabelle 5-1 Patientenkollektiv gruppiert nach dem Rezidivzeitpunkt .....	35
Tabelle 5-2 Patientenkollektiv gruppiert nach dem IPF-Score .....	35

## **10 Anhang**

### **10.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Alphabetische Auflistung meiner akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg:

Arabin, Bartsch, Bauer S., Bauer U.-M., Baum, Baumann, Becker A., Becker K., Becker S., Bender, Bertelmann, Bertoune, Bien, Braun, Brehm, Brendel, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Daniel, Dannlowski, Daut, Decher, Dellweg D., del Rey, Dettmeyer, Dieckhoff P., Dietz, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Ellenrieder, Enzensberger, Fendrich, Fenner, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Garten, Geks, Giese, Glatz, Görg C., Gress, Grgic, Grundmann, Grzeschik, Haberhausen, Häußermann, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Hüttner, Jaques, Jerrentrup, Jomaa, Kalder, Kann, Kanngießner, Kerwat, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Klose, Klug, Koczulla, Köhler S., König, Konrad, Koolmann, Kühne, Kühnert, Kussin, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüers, Maier, Maisch, Maisner, Maurer, Meißner, Merte, Metzelder, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Mylius, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Oertel, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Patrascan, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Ries, Riße, Roeßler, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schachtner, Schäfer H., Schäfer J., Schäfer M., Schieffer, Schmidt, Schneider, Schoner, Schröder, Schu, Schulze, Seifart, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sommer, Stahl, Steinfeld, Stiewe, Strik, Suske, Teymoortash, Vogelmeyer, Vogt, Vorwerk, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann Re., Westermann Ro., Wilhelm, Wißniowski, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zentgraf, Zoremba, Zwioerek.

## **10.2 Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Andreas Neubauer für die Bereitstellung des Themas und bei Frau PD Dr. Cornelia Brendel für die Möglichkeit zur Umsetzung desselben in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Frau Brendel stand mir während der gesamten Zeit mit Ideen und Ratschlägen zur Seite. Ohne ihre Leitung wäre die Realisation dieses Projektes nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich Frau Prof. Dr. Nina Timmesfeld für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung, sowie Prof. Dr. Michael Lohoff für die fachliche Hilfe im Bereich der Immunologie danken. Frau Prof. Dr. Anja Lorch war mit ihrer Expertise im Bereich der Hodentumore und ihrer Kenntnis der Patienten von unschätzbarem Wert für meine Arbeit.

Großer Dank geht an Gavin Giel für die unzähligen Stunden, die wir gemeinsam mit dem Sortieren meiner Proben verbracht haben. Kathleen Stabla möchte ich dafür danken, dass sie mich in die Methodik der qPCR eingeführt hat und auch sonst immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte. Gleiches gilt für Mihaela Pali und Larissa Greif, die ich ebenfalls stets um Hilfestellung in technischen Fragen bitten konnte.

Des Weiteren möchte ich Cordula Loechelt und Ramona Vietzke für die Bereitstellung der Proben und der dazugehörigen Patientendaten danken.

Ich danke auch den weiteren AG-Mitgliedern Phillip Nold für seine stete Bereitschaft IT-Probleme zu lösen und Katharina Henkenius für die vielen inspirierenden Gespräche.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für ihre finanzielle und ideelle, sowie meinem Lebensgefährten für die moralische Unterstützung.